

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase-Inhibitoren auf die Aktivität des Proteasoms

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Britt Friedel

aus Karl - Marx - Stadt

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Stangl

2. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

3. Prof. Dr. rer. nat. B. Dahlmann

eingereicht im Februar 2004

Datum der Promotion: 26. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	8
ABKÜRZUNGEN	10
1 EINLEITUNG	13
1.1 Statine – Eingriff in den Stoffwechselweg des Cholesterols auf Ebene der Mevalonsäure ...	13
1.1.1 Definition der Statine	13
1.1.2 Die Wirkung der Statine	14
1.1.3 Die pleiotropen Effekte der CSE-Hemmer	15
1.1.3.1 Direkte vaskuläre Effekte	16
1.1.3.1.1 Verbesserung der Funktion des Endothels	16
1.1.3.1.2 Verminderung der Proliferation glatter Muskelzellen	17
1.1.3.1.3 Statine und thrombotische Ereignisse	17
1.1.3.1.4 Wirkung auf zerebrale ischämische Ereignisse	18
1.1.3.2 Weitere Beispiele für pleiotrope Effekte	19
1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System - Ubiquitinierung, Degradation und Proteasom	21
1.2.1 Der strukturelle Aufbau des Proteasoms und dessen Funktion	21
1.2.1.1 Das 26S Proteasom	21
1.2.1.2 Der 19S Regulatorkomplex	22
1.2.1.3 Das 20S Proteasom	22
1.2.1.3.1 Die α -Untereinheiten	22
1.2.1.3.2 Die β -Untereinheiten	23
1.2.2 Das Proteasom und seine Funktion	24
1.2.3 Die Inhibition des Ubiquitin-Proteasomweges	25
1.2.4 Statine und ihr Einfluss auf das Proteasom	25

2	HERLEITUNG - STATINE UND DAS PROTEASOM	28
2.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System hat Bedeutung bei der Regulation wichtiger zellphysiologischer Prozesse	28
2.1.1	Zytotoxizität.....	28
2.1.2	Anti-Tumor Effekt	28
2.1.3	Hemmung der Antigenpräsentation	28
2.1.4	Antiinflammatorische Aktivität	29
2.2	Die antiinflammatorische Wirkung der Statine	30
2.3	Mechanismus der Proteasominhibition.....	31
3	MATERIAL UND METHODEN	32
3.1	Zellkultur	32
3.1.1	Material.....	32
3.1.2	Zusammensetzung der Nährlösungen	32
3.1.2.1	Nährmedium für VSMC-Zellen und EA.hy926-Zellen.....	32
3.1.2.2	Behandlungsmedium für VSMC-Zellen und EA.hy926-Zellen.....	33
3.1.2.3	Nährmedium und Behandlungsmedium für CPAE-Zellen.....	33
3.1.2.3.1	Herstellung des Behandlungsmediums für CPAE-Zellen.....	33
3.1.3	Gewinnung von VSMC (Primärkultur) aus der A. carotis der Ratte	33
3.1.3.1	Material	33
3.1.3.2	Herstellung der Kollagenase	33
3.1.3.3	Präparation der glatten Muskelzellen	34
3.1.3.4	Passagieren.....	34
3.1.4	Behandlung der Zellen mit CSE-Hemmern und Mevalonsäure	35
3.1.4.1	Material	35
3.1.4.2	Verfahrensweise.....	35
3.1.5	Färbung mit Trypanblau – Erstellung einer Wachstumskurve	36
3.1.6	XTT – Test: Testung der Viabilität nach Behandlung.....	36
3.1.6.1	Funktionsprinzip	36
3.1.6.2	Material	37
3.1.6.3	Prozedur	37
3.1.7	Darstellung der Zellen durch Färbung mit Phalloidin und DAPI	37
3.1.7.1	Funktionsprinzip der Färbung	37
3.1.7.2	Material	38

3.1.7.3	Färbung mit Phalloidin.....	38
3.1.7.4	DAPI-Kernfärbung.....	38
3.1.8	Ernte und Lyse der Zellen	39
3.2	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA)-Assay	40
3.2.1	Funktionsprinzip der BCA-Proteinbestimmung	40
3.2.2	Material	40
3.2.3	Arbeitsschritte	40
3.3	Messung der Proteasomaktivität mit fluorogenen Substraten.....	41
3.3.1	Funktionsweise der fluorogenen Substrate	41
3.3.2	Material	41
3.3.2.1	Herstellung des 2 x 26S – Inkubationspuffers.....	42
3.3.2.2	Ansatz des Mastermixes.....	42
3.3.3	Messung der Proteasomaktivität im Zellextrakt	42
3.3.4	Aktivitätsbestimmung am gereinigten 20S Proteasom	43
3.3.4.1	Material	43
3.4	Auswertung und Statistik	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Zelluläre Wirkung von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern.....	45
4.1.1	Phänotypische Merkmale und Veränderungen	45
4.1.1.1	Behandlung der Endothelzelllinie CPAE mit Statinen.....	46
4.1.1.2	Merkmale einer Behandlung der Zellen mit dem irreversiblen Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin	50
4.1.1.3	Einfluss der alleinigen Behandlung mit Mevalonsäure und Effekte von Mevalonsäure β -clasto Lactacystin und in Kombination mit Statinen.....	50
4.1.2	Einfluss der Statine und die simultane Mevalonsäuregabe auf die Viabilität der CPAE-Zellen 52	
4.1.3	Vitalität und Wachstum der EA.hy926-Zellen nach 24-Stunden-Behandlung mit Statinen.....	54
4.2	Der Eingriff in den Cholesterolfstoffwechselweg und seine Effekte auf die Aktivität des Proteasoms	56
4.2.1	Die Wirkung der CSE-Hemmer auf die proteasomale Aktivität vaskulärer Zelllinien	56
4.2.1.1	CPAE-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung über 6 Stunden	58

4.2.1.1.1	Simvastatin (Prodrug)	58
4.2.1.1.2	Atorvastatin.....	60
4.2.1.1.3	Pravastatin.....	61
4.2.1.1.4	Einfluss von Mevalonsäure in Kombination mit Statinen auf die Proteasomaktivität.....	63
4.2.1.2	EA.hy926-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung über 6 Stunden	64
4.2.1.3	CPAE-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung über 24 Stunden	66
4.2.1.3.1	Simvastatin (Prodrug)	66
4.2.1.3.2	Atorvastatin.....	67
4.2.1.3.3	Pravastatin.....	68
4.2.1.3.4	Einfluss einer simultanen Gabe von Mevalonsäure auf die Proteasomaktivität	69
4.2.1.4	EA.hy926-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung nach 24 Stunden	71
4.2.1.5	VSMC: Ergebnisse einer Statinbehandlung nach 24 Stunden	72
4.2.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Statinbehandlung.....	73
4.2.3	Die Wirkung von Mevalonsäure auf das Proteasom der Zelle	74
4.3	Das isolierte 20S Proteasom - Wirkung von der Statine und Mevalonsäure	76
4.3.1	Effekte von 100 µM HMG-CoA-Reduktase-Hemmer auf 20S Proteasomen.....	76
4.3.2	Effekte der Inkubation mit Mevalonsäure	78
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	79
5	DISKUSSION	81
5.1	Statine und ihre Wirkung auf das Proteasom	81
5.1.1	Statine waren keine Hemmer des 20S Proteasoms	81
5.1.2	Mevalonsäure hatte keinen Einfluss auf die Proteasomaktivität.....	83
5.1.3	Wirkmechanismus der Statine und des Proteasominhibitors Lactacystin.....	83
5.1.3.1	Statine und β-clasto Lactacystin induzierten massive Zellveränderungen.....	83
5.1.3.1.1	Pravastatin zeigte weniger deutlich ausgeprägte Struktureffekte	84
5.1.3.1.2	Die Wirkung der Statine auf die verschiedenen Zelllinien stand in Abhängigkeit der Zelleigenschaften	84
5.1.3.2	Mevalonsäure hob die lactacystin-induzierten Strukturveränderungen nicht auf	85
5.1.3.3	Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase könnten Veränderungen am Aktinzytoskelett auftreten.....	86
5.1.3.4	Lactacystin führte über einen bisher unbekannten Mechanismus zu den Zellveränderungen.....	87
5.1.4	Im Zellmodell hatten die Statine nur einen geringen Einfluss auf das Proteasom.....	88
5.1.4.1	Atorvastatin, die offene Ringform, hemmte leicht die TL in den CPAE-Zellen und die ChTL in den VSMC-Zellen.....	88
5.1.4.2	Keine Proteasominhibition durch die Statine	88

5.1.4.3	Mevalonsäure konnte nicht als Modulator der Proteasomaktivität erkannt werden	90
5.2	Statine und ihr Einfluss auf die Zellen	91
5.2.1	Statine hatten antiproliferative Eigenschaften	91
5.3	Die Auswirkungen einer Hemmung des Proteasoms	92
5.3.1	Die geringen Atorvastatineffekte sind physiologisch nicht bedeutsam	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	93
	LITERATURVERZEICHNIS	94
	DANKSAGUNG	101
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	102

Abstrakt

Statine werden in der Therapie von Hypercholesterolämie sehr effektiv eingesetzt. Durch ihren Eingriff in den Cholesterolfstoffwechsel über eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase wird die Bildung des Cholesterols verhindert. Aus therapeutischer Sicht wirken sie sich auf diese Weise sehr günstig auf atherosklerotische Veränderungen aus.

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass β -clasto Lactacystin, ein bekannter Proteasominhibitor, und die CSE-Hemmer gemeinsame biologische Wirkungen aufweisen. Weiterhin ließ sich eine strukturelle Ähnlichkeit, in Form des β -Laktonrings, zwischen den Statinen und β -clasto Lactacystin erkennen [Rao 1999]. Aufgrund dieser Parallelitäten wurde vermutet, dass die Statine ihre Wirkung zum Teil über eine Hemmung des Proteasoms entfalten.

In Zellkulturexperimenten wurden die Effekte von Simvastatin (Prodrug), Atorvastatin, Pravastatin und dem Proteasomhemmer Lactacystin auf zwei Endothelzelllinien (CPAE und Ea.hy926) und primäre vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) bezüglich ihres Verhaltens auf die Morphologie, die Proliferation, die Viabilität und die Proteasomaktivität untersucht. Sowohl die Statine als auch Lactacystin induzierten vergleichbare morphologische Veränderungen und beeinflussten die Proliferation von CPAE-Zellen. In den eigenen Versuchen konnten die durch Statine induzierten Effekte durch Mevalonat revertiert werden. Die durch Lactacystin verursachten Veränderungen wurden durch Mevalonsäure nicht beeinflusst. Wie erwartet hemmte Lactacystin in den untersuchten CPAE-Zellen signifikant die proteasomale Aktivität. Im Gegensatz dazu blieb die Proteasomaktivität nach einer Statinbehandlung unbeeinflusst. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in den Ea.hy926 und den VSMCs deutlich. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sogar hohe Dosen der Statine die Aktivität der gereinigten 20S Proteasomen nicht modulieren.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die ähnlichen biologischen Effekte der Statine und des Lactacystins nicht über einen gemeinsamen Mechanismus der Proteasominhibition funktionieren.

Die Statine spielen bei der Regulation des Cholesterolfstoffwechsels eine entscheidende Rolle. Diese Substanzen können sehr erfolgreich in der Therapie atherosklerotischer Erkrankungen

eingesetzt werden. Ihre positiven Eigenschaften lassen sich nicht durch eine Modulation der Proteasomaktivität erklären.

Schlagwörter: Statine, β -clasto Lactacystin, Strukturähnlichkeit, Morphologie, Modulation der Proteasomaktivität

Abstract

Statins are utilised very efficient in the treatment of hypercholesterolemia. By their direct intervention in the metabolism of cholesterol via an inhibition of HMG-CoA-reductase a formation of cholesterol is prevented. Thus these substances have a beneficial effect on atherosclerotic changes.

In a lot of studies β -clasto lactacystin, a well known inhibitor of the proteasome, and statins were shown to have common biological effects. The statins and β -clasto lactacystin have a similarity in structure in form of a β -lactone ring. Because of these parallelisms it was assumed that statins deploy their effects partly though inhibition of the proteasome.

The effect of simvastatin, atorvastatin and pravastatin as well as of the proteasome inhibitor β -clasto lactacystin was studied on morphology, proliferation, viability and on proteasomal activity in two mammalian endothelial cell lines (CPAE and Ea.hy926) and in primary vascular smooth muscle cells (VSMCs). Both statins and lactacystin induced comparable morphological changes and attenuated proliferation of CPAE. Whereas the statin-induced effects were reversed by mevalonic acid, however, the lactacystin-induced alterations were not influenced by mevalonic acid. As expected, lactacystin caused a significant loss of proteasomal activity measured in the extracts of treated cells. The extracts of statin-treated CPAEs exhibited unchanged activities. This result was also confirmed in Ea.hy926 cells and in primary rat VSMCs. It is shown, that even high dosis of statins do not modulate the activity of purified human 20S proteasomes.

The conclusion was that similar biological effects of statins and the well known proteasome inhibitor lactacystin in vascular cells are not caused by a common inhibitory mechanism of action on the proteasome.

Statins play an important role in the regulation of metabolism of cholesterol. These substances are used successful in the therapy of atherosclerotic lesions. However their positive features cannot be defined by modulation of proteasome activity.

Keywords: statins, β -clasto lactacystin, similarity in structure, morphology, modulation of proteasome activity

Abkürzungen

- ATP Adenosintriphosphat
- BzVGR Bz-Valin-Glycin-Arginin-AMC
- bzw. beziehungsweise
- CaspL caspase-like
- cdk cyclin dependent kinase
- CHO-Zellen chinese hamster ovarial - Zellen
- ChTL chymotrypsin-like
- CPAE-Zellen calf pulmonal arterial endothelcell-Zellen
- CSE Cholesterolsyntheseenzym
- DAPI 4,6-Diamidino-2-Phenylindol
- DMEM Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
- DMSO Dimethylsulphoxid
- DTT Dithiothreitol
- eNOS endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
- FCS foetal calf serum
- FITC Fluoreszein Isothiocyanat
- FPP Farnesylpyrophosphat
- GDP Guanidindiphosphat
- GTP Guanidintriphosphat
- GGPP Geranylgeranylpyrophosphat
- HDL high density lipoprotein

• HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
• IκB	Inhibitor kappa B
• LDL	low density lipoprotein
• MCA / AMC	7-Amido-4-Methylcoumarin
• MEM	Minimal Essential Medium
• MHC	major histocompatibility complex
• MRI	Magnetic Resonance Imaging
• NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
• NFκB	Nuclear Factor kappa B
• NO	Stickstoffmonoxid
• OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
• oxLDL	oxidiertes LDL
• PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
• PBS	phosphate buffered saline
• PC	Phosphokreatin
• PCK	Phosphatkreatinkinase
• PDGF	platelet derived growth factor
• PGPH	Peptidylglytamylopeptidhydrolase
• PP	Pyrophosphat
• PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
• PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty
• rpm	rounds per minute
• RT	Raumtemperatur

- TBS triton buffered solution
- TF tissue factor
- TL trypsinlike
- TNF tumor necrosis factor
- SLLVY Syccinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-AMC
- VSMC vascular smooth muscle cell
- ZLLE Z-Leucin-Leucin-Glutaminsäure-AMC

1 Einleitung

1.1 Statine – Eingriff in den Stoffwechselweg des Cholesterols auf Ebene der Mevalonsäure

1.1.1 Definition der Statine

Statine werden für die Pharmakotherapie der Hypercholesterolämie eingesetzt. Sie greifen durch die Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-(HMG-CoA)-Reduktase in den Stoffwechsel des Cholesterols ein. Dies führt zu einer Senkung der Plasmakonzentration von Cholesterol und insgesamt zu einer positiven Veränderung des Lipidprofils. Besonders das LDL, das low density lipoprotein, einer der Hauptfaktoren in der Genese atherosklerotischer Erkrankungen, wird durch vermehrten Abbau und eine Erhöhung der Syntheserate der LDL-Rezeptoren in der Leber deutlich gesenkt. Weiterhin führt eine Behandlung mit diesen Pharmaka zu einer Steigerung der HDL-Komponente (high density lipoprotein) [Forth 1996].

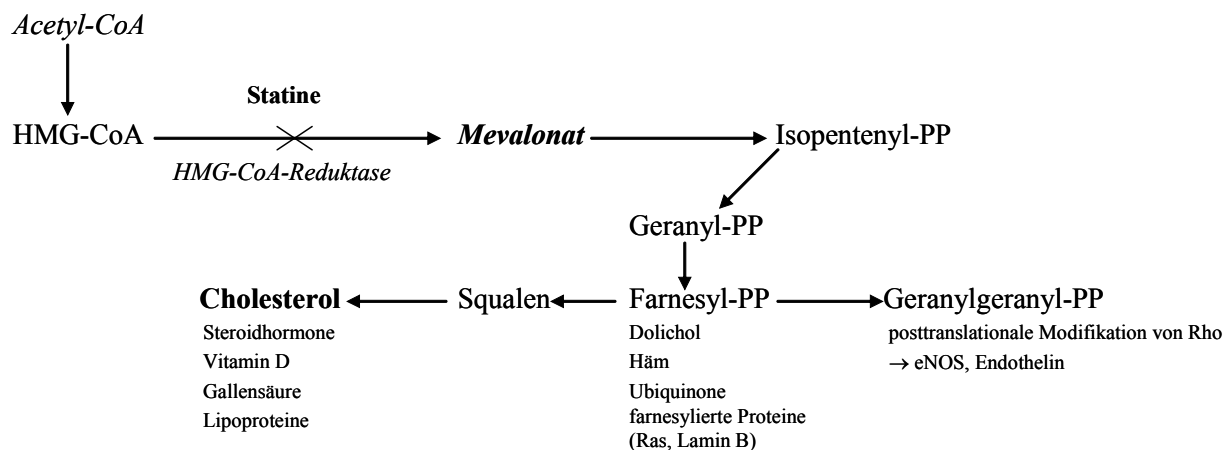


Abb. 1: Stoffwechselweg des Cholesterols: Statine blockieren die Synthese von Cholesterol. Auf diese Weise wird die Bildung von Mevalonsäure und der isoprenoiden Zwischenprodukte verhindert. Durch diesen Eingriff wird die Modifikation verschiedener Proteine beeinflusst (modifiziert nach [Laufs 2000, Goldstein 1990]).

1.1.2 Die Wirkung der Statine

In primären (WOSCOPS, MIRACLE) ebenso wie in sekundären Präventionsstudien (4S, MAAS, MRFIT) konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Statinen die Morbidität und die Mortalität signifikant abnahmen. Bei der Patientengruppe in der 4S Studie waren bereits nach einer Behandlungsdauer von 6 Wochen die Cholesterolverte um durchschnittlich 28 % und die LDL-Werte um 38 % gesunken. Diese Therapie ging, im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Patienten, mit einer 42 %igen Reduktion des Risikos einher, am koronaren Herztod zu versterben. Diese Zahl verdeutlichte, dass sich die Überlebenschance nach einem akuten kardiovaskulären Ereignis unter der Therapie mit Statinen verbesserte [MAAS 1994].

Die Untersuchungsergebnisse der WOSCOP-Studie wiesen darauf hin, dass mit einer durchschnittlichen Senkung der LDL-Werte um 24 % der Nutzen der Therapie, welcher bei einer 45prozentigen Reduktion des Risikos bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse liegt, weitgehend ausgeschöpft ist. Eine weitere Senkung konnte den Erfolg der Therapie nicht wesentlich steigern. Außerdem wurde festgestellt, dass ein Therapienutzen auch unabhängig vom Basalwert des LDL sowie des HDL erzielt werden konnte. Darüber hinaus gab es eindeutige Belege dafür, dass eine frühzeitige Behandlung mit Simvastatin das Risiko senkt, dass sich der Patient einer koronaren Bypass-Operation oder einer Angioplastie (PTCA) unterziehen muss [WOSCOP 1998]. Jedoch schien diese Wirkung auf die koronare Herzerkrankung erst nach einer einjährigen Behandlungsdauer zu beginnen [4S 1994]. Die angiographisch darstellbare Progression bezüglich des Durchmessers der Stenose trat in der Simvastatingruppe weniger häufig auf. Im Gegenteil, es wurde sogar eine Regression der pathologischen Veränderungen beobachtet [MAAS 1994]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Untersuchungen der Plaquegröße mittels MRI gesehen: Nach einer 12monatigen Therapie wurden eine signifikante Reduktion der Wanddicke sowie des Gefäßwandareals, ohne Veränderungen in der Lumengröße, beobachtet. Langfristig vergrößerte eine effektive Behandlung mit Statinen auch signifikant den Durchmesser des Gefäßes, was durch eine fortschreitende Umbildung der Arterienwand erreicht wurde [Corti 2002].

Der pathophysiologische Mechanismus des Wiederaufbaus der ursprünglichen Gefäßstruktur ist noch nicht im Detail geklärt. Das Zusammenspiel einzelner komplexer Faktoren könnte bei andauernder Therapie einen positiven Einfluss ausüben. Zu diesen Faktoren zählen zum Beispiel die Hemmung der durch LDL-Cholesterol vermittelten Entzündungsvorgänge, eine verbesserte

Endothelfunktion, der Rückgang des Einflusses von oxidativem Stress sowie das sinkende Thromboserisiko. In der Langzeittherapie schien der Hauptgrund für eine bessere Überlebenschance die Stabilisierung koronarer Läsionen zu sein.

Andererseits wiesen die Cholesterolsyntheseenzym-(CSE)–Hemmer bereits innerhalb weniger Wochen heilsame physiologische Effekte auf. Neben der effektiven Senkung der Blutfette verbesserten Statine nach einem akuten koronaren Ereignis die Endothelfunktion [RECIFE Trial 1999], verminderten die Aggregationsfähigkeit der Plättchen und reduzierten die Ablagerung von Thromben. Von diesen Mechanismen profitierten die Patienten vor allem in der frühen Phase nach einem akuten Koronarsyndrom [MIRACLE 2001]. Diese so genannten pleiotropen Effekte der Statine sind in der Therapie neben einer Regulation der Blutfettwerte von entscheidender Bedeutung.

1.1.3 Die pleiotropen Effekte der CSE-Hemmer

Durch das pleiotrope Wirkspektrum von CSE-Hemmern wird bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine verbesserte Perfusion des Myokards erreicht. Insgesamt wird die NO-abhängige Endothelfunktion gebessert. Aller Wahrscheinlichkeit nach werden diese Effekte durch eine Hemmung der Funktionsfähigkeit der kleinen G-Proteine, wie Rho und Rac, hervorgerufen. Des Weiteren wird ein direkter Einfluss der Statine auf die Gefäßwand angenommen [Werner 2002], da diese Effekte bereits nach kurzzeitiger Therapiedauer beobachtet werden.

Es gibt klinische und experimentelle Anhaltspunkte dafür, dass verschiedene wichtige Gene, die für die Kontrolle der endothelialen Funktion, der Entzündung und der Plaquestabilität von zentraler Bedeutung sind, durch CSE–Hemmer reguliert werden. Dazu gehören zum Beispiel die endotheliale NO-Synthetase (eNOS), Endothelin [Hernandez-Perera 2000] sowie MHC-II [Werner 2002].

1.1.3.1 Direkte vaskuläre Effekte

Mit dem Eingriff in den Stoffwechselweg des Cholesterols wird neben der Entstehung von Mevalonsäure auch die Bildung weiterer Zwischenprodukte wie Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) gehemmt. Diese Isoprenoide sind wichtig für die posttranslationale Modifizierung verschiedener Proteine [Werner 2002]. Dies hat besonders für die kleinen GTP-bindenden Proteine Ras und die Ras-ähnlichen, wie Rho, Rab, Rac und andere, Bedeutung. Durch die Prenylierung gehen die Proteine aus dem inaktiven GDP-gebundenen in ihren aktiven GTP-gebundenen Zustand über und können eine Reihe von Signalkaskaden auslösen [Laufs, Liao 1998].

Bei den vaskulären Prozessen spielt besonders Rho eine wichtige Rolle. Rho wird durch die Anwesenheit von GGPP in seine aktive Form gebracht [Laufs 2000]. Über diesen Weg kann das Aktinzytoskelett verändert und Einfluss auf den intrazellulären Transport, mRNA-Stabilität und die Transkription von Genen genommen werden [Laufs und Liao 2000]. Durch den Eingriff in die zelluläre Signaltransduktion können folglich Signalantworten wie die DNA-Synthese, mRNA-Synthese sowie Proteinsynthese und Proteinexpression reguliert werden [Fenton II 2002]. Dieser Mechanismus soll an einigen ausgewählten Beispielen erklärt werden.

1.1.3.1.1 Verbesserung der Funktion des Endothels

Die endotheliale Dysfunktion resultiert aus schädigenden Einflüssen auf die Innenschicht der Gefäßwand. Zahlreiche exogene sowie endogene Noxen fördern ein Fortschreiten und begünstigen die Ausbildung von Atherosklerose. Durch diese strukturellen Veränderungen der Gefäßwand wird die Bioverfügbarkeit von NO herabgesetzt, was wiederum die Progression der Atherosklerose begünstigt. Statine greifen in diesen Kreislauf positiv ein.

Die Dysfunktion des Endothels charakterisiert sich durch eine beeinträchtigte Erweiterung (Dilatation) der Gefäße. Sie entsteht vorwiegend durch eine verringerte Synthese, Freisetzung und Aktivität des endothelabhängigen Stickstoffmonoxides. NO seinerseits gewährleistet eine suffiziente Relaxation des Gefäßes und verhindert die Aggregation von Thrombozyten. Weiterhin wird das Wachstum der glatten Muskelzellen ebenso wie die Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten durch NO reguliert. Wenn durch pathologische Veränderungen die natürliche Funktion des Endothels nicht mehr gewährleistet ist, kann an dieser Stelle durch

Statine positiv entgegengewirkt werden. Statine steigern die Bioverfügbarkeit von NO. Die verbesserte Bioverfügbarkeit wiederum wird durch eine hochregulierte Expression von eNOS erreicht. Es wird angenommen, dass die Hemmung der kleinen GTP-bindenden Proteine, in dem Fall Rho, den zugrunde liegenden Mechanismus bilden. Durch die Inhibition von Rho bleibt die Rho-Kinase inaktiv, worüber die Halbwertszeit der mRNA von eNOS verlängert wird [Laufs 2000].

1.1.3.1.2 Verminderung der Proliferation glatter Muskelzellen

Einen weiteren pathogenetischen Faktor der Atherosklerose stellt der pathologische Proliferationsreiz für die glatten Muskelzellen dar [Stobbe 1996]. Über verschiedene Wege wird der stark mitogene Faktor PDGF vermehrt gebildet, was eine Proliferation der Muskelzellen verursacht. Die Proliferation der Zellen wird in Abhängigkeit der kleinen GTP-bindenden Proteine reguliert [Negre-Aminou 1997]. Diese Proteine greifen insofern in den Zellzyklus ein, als dass sie die Aktivität von Zyklinen und den zyklinabhängigen Kinasen beeinflussen [Laufs 2000]. Somit können bei Senkungen des zellulären Gehalts an Mevalonsäure durch Statine wachstumshemmende Effekte beobachtet werden.

Der entscheidende Schritt liegt auf der Ebene der Formation von Isoprenoidderivaten. Wird deren Bildung gehemmt, sinkt die PDGF-induzierte DNA-Synthese in den glatten Muskelzellen der Mediaschicht des Gefäßes. Daraufhin wird die Hyperphosphorylierung des PDGF-induzierten Retinoblastomproteins erniedrigt und die Aktivität der cdk sinkt ab. Auf diese Weise steigt die Menge an vor allem p27^{Kip 1}, einem cdk-Inhibitor, an und die Proliferation wird zwischen der G₁-Phase und der S-Phase des Zellzyklus blockiert [Takemoto 2001].

1.1.3.1.3 Statine und thrombotische Ereignisse

Im Rahmen der Atherogenese kommt es im Gefäßbett zur Entstehung von Plaques. Ein weiteres Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion kann dazu führen, dass der Plaque rupturiert und die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert wird. Dabei wirkt eine Hypercholesterolämie steigend auf die Reaktivität der Plättchen. Als Folge erleidet der betreffende Patient ein akutes Koronarsyndrom oder im schlimmeren Fall einen totalen Verschluss des Gefäßes [Takemoto 2001]. Durch die Behandlung mit CSE-Hemmern wird über den Mechanismus der limitierten

Proteinprenylierung eine chronische Generation von Thrombin auf zellulärer Ebene durch ein Absinken des Plasmagehalts an Gewebefaktor (TF) und Plasminaktivator-Inhibitor 1 (PAI 1) gehemmt. Da PAI 1 somit nicht genügend vorhanden ist, um die Reaktion des geweblichen Plasminaktivators zu neutralisieren, kann ausreichend Plasmin gebildet werden. Auf diese Weise kann effektiv in thrombolytische Prozesse eingegriffen werden [Fenton II 2001].

1.1.3.1.4 Wirkung auf zerebrale ischämische Ereignisse

Untersuchungen ergaben, dass die Gehirndurchblutung und der zerebrale Gefäßtonus durch das endogen gebildete NO reguliert wurden [Harrison 1997]. Weitere Experimente, in denen nach einem kleinen ischämischen Infarkt eine gesteigerte Perfusion durch die Hemmung der Rho-GTP-Bindung erreicht wurde, verdeutlichten die vorhandenen Ergebnisse. Die Applikation von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren erhöhte über den bereits erklärten Mechanismus die Expression von eNOS und führte somit zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit von NO [Endes 1998]. So fiel bei Patienten mit CSE-Hemmer-Therapie nach einem Gefäßverschluss die Größe des betroffenen Infarktgebiets geringer aus. Insgesamt konnte durch die Therapie mit Statinen die zerebrale Durchblutung durch die verbesserte Funktion von eNOS und die sich daraus ergebende vermehrte Bildung von NO positiv beeinflusst werden [Laufs 2000]. Die Antiplättchen- und Antileukozytenfunktion von NO widerspiegelte sich in verstärkten Kollateralflüssen und einer zunehmenden Mikrozirkulation.

Die verbesserte Endothelfunktion spielte eine wesentliche Rolle, jedoch konnten diese Ergebnisse nicht ausschließlich dieser Tatsache zugeschrieben werden. Es müssen weitere Faktoren der Atherogenese in Betracht gezogen werden, die durch die Statine positiv beeinflusst werden.

1.1.3.2 Weitere Beispiele für pleiotrope Effekte

Tab. 1: Zusätzliche pleiotrope Wirkungen von CSE-Hemmern, die das kardiovaskuläre System nicht direkt betreffen (in Anlehnung an [Fenton II 2002]).

Aktivität und Effekt
<ul style="list-style-type: none">• G₁-Phase Wachstum von CHO-Zellen sinkt• Überleben nach Lipopolysaccharid-induzierter Sepsis steigt bei Mäusen• Förderung der Angiogenese• Zunahme der Knochendichte bei verringerter Osteoklastenaktivität• Frakturrisiko nimmt ab• Entzündungsreaktion und die atherosklerotische Aktivität sinken• die Histokompatibilität und die Antwort der T-Zellen werden erniedrigt• Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 wird gebremst• abnehmende Häufigkeit von Demenzen

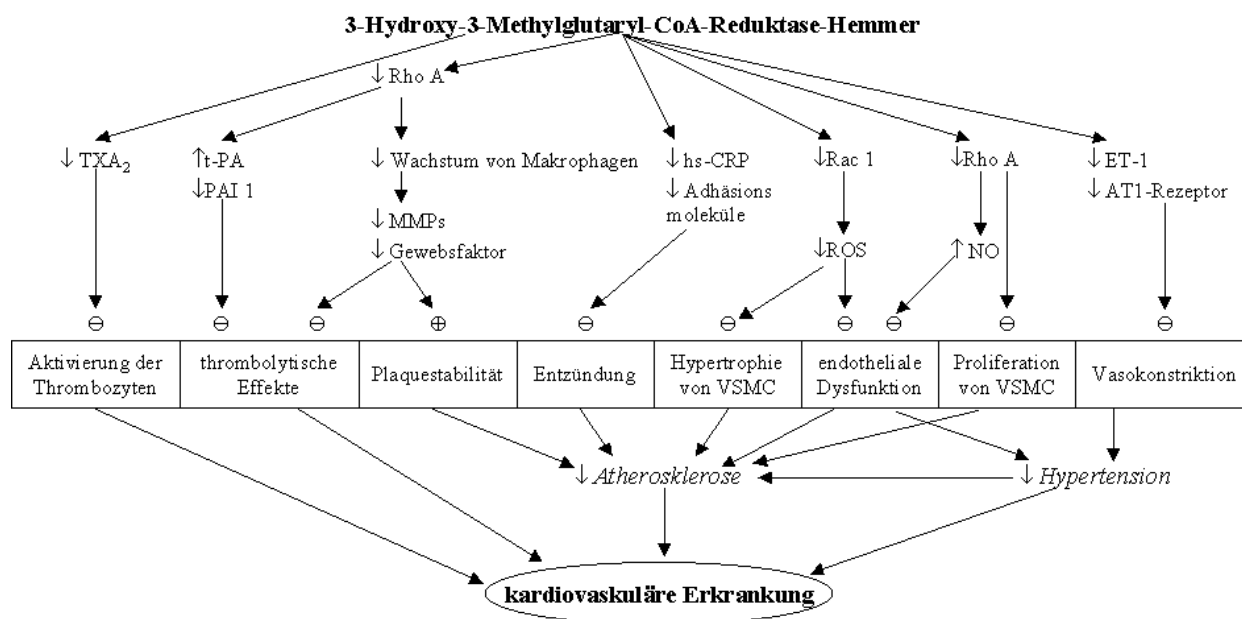


Abb. 2: Zusammenfassung der Einflüsse von Statinen auf das kardiovaskuläre System (Abwandlung der Vorgabe nach [Takemoto 2001])

Die Ursachen der Statineffekte, die scheinbar unabhängig vom Mevalonsäureweg sind, wurden bisher noch nicht vollständig aufgeklärt.

Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass CSE-Hemmer und Proteasominhibitoren, wie beispielsweise Lactacystin und MG 132, gemeinsame Eigenschaften in ihrer biologischen Wirkung haben. Zum Beispiel: die Regulation von Zellzyklusfaktoren wie p27, ihren Einfluss auf das Wachstum sowie die Differenzierung glatter Muskelzellen der Gefäße. Die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren zeigen ähnliche regulatorische Muster auf die Aktivität von eNOS und die Wirkungsweise von Entzündungsmediatoren. So stellt sich Frage, ob die Parallelität der Effekte sich über einen gleichen Wirkmechanismus, namentlich der Hemmung des Ubiquitin-Proteasomweges, erklären lässt [Rao 1999].

1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System - Ubiquitinierung, Degradation und Proteasom

1.2.1 Der strukturelle Aufbau des Proteasoms und dessen Funktion

1.2.1.1 Das 26S Proteasom

Das 26S Proteasom wird als das aktive Partikel für den Abbau von Zellproteinen betrachtet. Es ist für den ATP-abhängigen Abbau ubiquitinierten und einiger nicht ubiquitinierten Proteine in eukaryotischen Zellen zuständig. Aus Untersuchungen ging hervor, dass das 20S Proteasom zwar *in vitro* aktiv sein kann, jedoch in der Zelle nur mittels eines gebundenen regulatorischen Komplexes seine Aufgabe erfüllt [DeMartino 1999]. Demzufolge setzt sich *in vivo* das Proteasom aus dem proteolytischen Kernpartikel (20S) und einem Regulatorkomplex als Kappe zusammen [Löwe 1995]. Dieser Regulatorkomplex wird ATP-abhängig an das 20S Proteasom gebunden. Somit ist der Aufbau des 26S Proteasoms ein ATP-abhängiger Prozess [Coux 1996, Ferrell 2000].

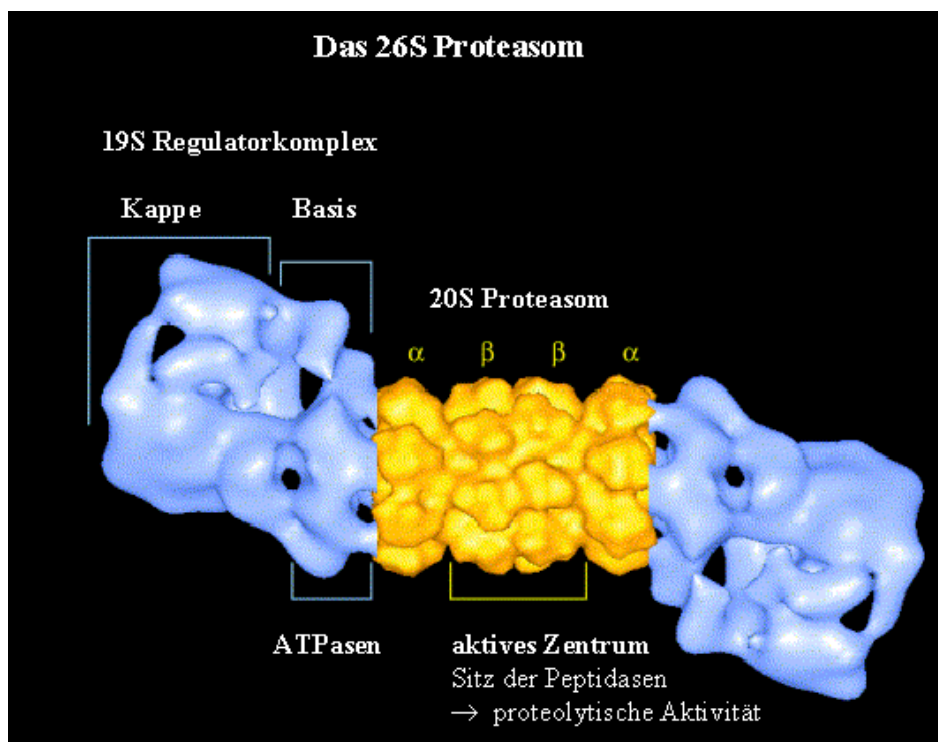


Abb. 3: Aufbau des 26S Proteasoms. Das Zellpartikel ist aus einem Regulatorkomplex und dem proteolytisch aktiven 20S Kernpartikel aufgebaut. Der Regulatorkomplex ist für die Substratbindung (Kappe), dessen Entfaltung sowie die Translokation (Basis) zuständig (verändert nach [Kisselev 2001]).

1.2.1.2 Der 19S Regulatorkomplex

Der 19S Komplex besitzt eine Sequenz, mit der polyubiquitinierte Substanzen erkannt werden. Durch die Aktivität der Isopeptidase kann die Polyubiquitinkette zu Ubiquitin-Monomeren gespalten werden [Ferrell 2000]. Mittels Bindung an die beiden Enden des 20S Abschnittes wird die Öffnung in den engen Kanal in das Innere des proteolytischen Komplexes reguliert [Groll 2000]. Bevor die Proteine den Eingang passieren können, müssen sie erst entfaltet werden, wofür ebenfalls die Regulatorkomplexe verantwortlich sind.

1.2.1.3 Das 20S Proteasom

Der strukturelle Aufbau dieses multikatalytischen Zellpartikels wurde mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur in verschiedenen Untersuchungen an Hefe und dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein zylinderähnliches Partikel, das sich aus vier aufeinander gestapelten Ringen bildet. Die beiden äußeren Ringe setzen sich ausschließlich aus α -Untereinheiten zusammen, während die inneren beiden β -Untereinheiten sind. Pro Ring sind jeweils weitere sieben verschiedene Untereinheiten zu verzeichnen, die sich in ihrer Reihenfolge im gegenüberliegenden anderen Ring wiederholen. Da sich das 20S Proteasom aus zwei identischen Hälften aufbaut, entsteht eine siebenfache Symmetrie des Partikels [Coux 1996]. Der zentrale Penetrationskanal stellt sich im Inneren als Hohlraum dar. Dieser verengt sich nach beiden Seiten zur Peripherie hin [Löwe 1995].

Die Struktur der α - sowie der β -Untereinheit zeigt eine auffallende Ähnlichkeit. Außerdem ist die Bindung zwischen den beiden Strukturelementen sehr eng [Löwe 1995].

1.2.1.3.1 Die α -Untereinheiten

Diese Untereinheit ermöglicht dem Proteasom die beschriebene Ringstruktur auszubilden. Außerdem ist sie notwendig, um die β -Ringe zu formen. Durch den Komplex α -Untereinheiten wird eine physiologische Barriere gewährleistet. Dadurch wird der Einstrom zytosolischer Proteine in das Innere des proteolytischen Partikels begrenzt. Von der äußeren Seite binden regulatorische Komplexe, welche die Aktivität der Proteolyse modulieren [Coux 1996].

1.2.1.3.2 Die β -Untereinheiten

In diesem Strukturelement befinden sich diejenigen Abschnitte, die der eigentlichen proteolytischen Aktivität dienen. Die aktive Seite ist im Inneren des zentralen Zylinders lokalisiert. Durch die Arbeit mit fluorogenen Substraten konnten drei verschiedene Aktivitäten identifiziert werden, die sich in ihrer proteolytischen Spezifität unterscheiden. Die β 5-Untereinheit weist eine chymotrypsin-ähnliche Aktivität (ChTL) auf und spaltet Proteine vorzugsweise nach hydrophoben Resten. Die auf β 1 lokalisierte caspase-ähnliche Aktivität (CaspL) spaltet bevorzugt die gebundenen Proteine nach sauren Resten. Der historische Name dieser Aktivität ist Peptidylglytamylopeptidhydrolase (PGPH), jedoch wurde er verlassen, da die Spaltung nach Aspartatresten schneller erfolgt als nach Glutamat. Auf der β 2-Untereinheit ist die trypsin-ähnliche Aktivität (TL) gelegen, die Proteine nach basischen Aminosäuren spaltet [Kisselev 2001].

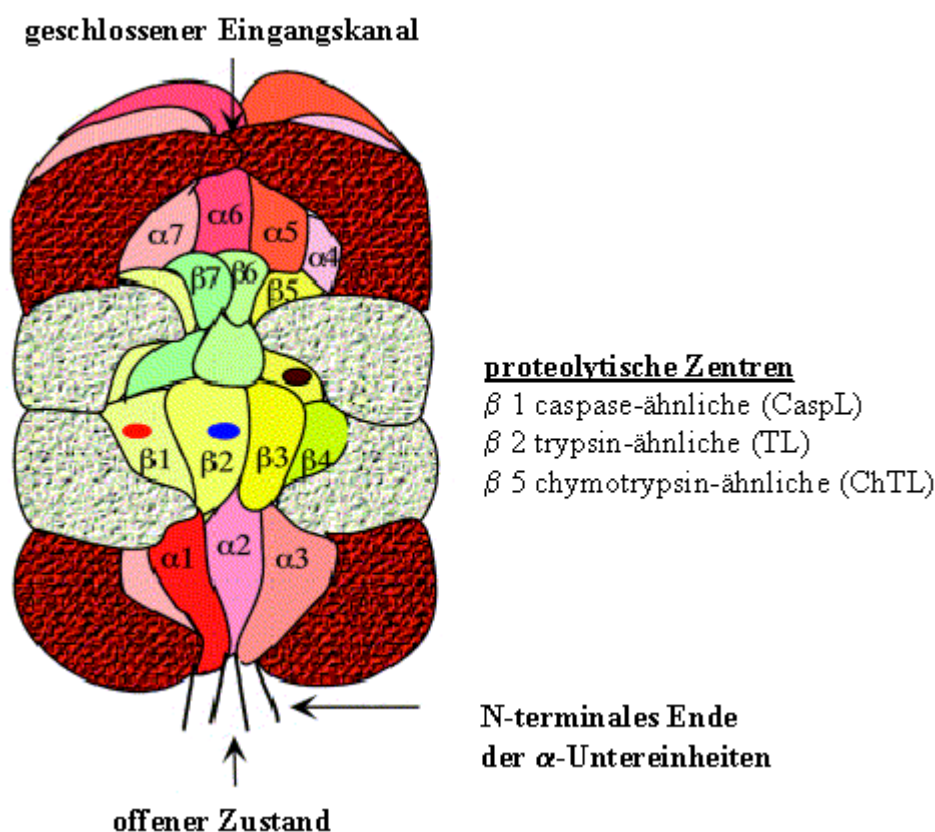


Abb. 4: Der strukturelle Aufbau des 20S Proteasoms (modifiziert nach [Kisselev 2000]).

1.2.2 Das Proteasom und seine Funktion

Das Zusammenspiel vieler zellulärer Proteine wird durch das proteolytische System kontrolliert. Der multikatalytische Proteasekomplex, welcher sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert ist, stellt daher das zentrale Element des Proteinabbaus dar. Es werden eine Vielzahl kurzlebiger, aber auch langlebiger Proteine über diesen Weg entfernt. Die Funktion des 26S Proteasoms ist bei vielen biologischen Prozessen von entscheidender Bedeutung, denn dieses System ist in die Regulation vieler zellulärer Vorgänge einbezogen [Desterro 2000]. An physiologischen Prozessen beteiligte Proteine werden über diesen Weg in ihrer Aktivität in ein Gleichgewicht gebracht.

Tab. 2: Physiologische Funktion und ausgewählte Proteinsubstrate des Proteasomweges (abgewandelt nach [Kisselev 2001]).

Funktion	Substrate
• Progression des Zellzyklus:	p27 ^{Kip1} , p21, Zyklone
• Apoptose:	p53, p27 ^{Kip1} , bax, IκB
• Regulation der Genexpression:	c-Jun, E2F1, β-Catenin
• Entzündung:	IκB
• Phosphorylierung:	Proteinkinase A (regulatorische Untereinheit)
• Regulation metabolischer Wege:	Ornithin Dekarboxylase, HMG-CoA-Reduktase
• Immunüberwachung:	zytosolische und nukleäre Proteine

1.2.3 Die Inhibition des Ubiquitin-Proteasomweges

Die Proteasomen gehören in die Gruppe der N-terminal nukleophilen Hydrolasen. An den Seitenketten der β -Untereinheiten liegen N-terminal Serin-, Threonin- oder Cysteinreste [Kisselev 2001]. Aus Mutationsstudien ging hervor, dass vorwiegend die Hydroxylgruppe des terminalen Threoninrestes als katalytisches Nukleophil genutzt wird. Die abzubauenen Polypeptidketten werden komplett in kleine Peptide zwischen 3 und 20 Resten gespalten. Die weitere Hydrolyse wird durch andere Proteasen übernommen [Lee 1998].

Unterschiedliche Proteasominhibitoren modifizieren kovalent vor allem den Threoninrest der β -Untereinheiten. Die Inhibitoren MG 132 und MG 262 binden reversibel, β -clasto Lactacystin und Epoxomicin irreversibel. Auf diese Weise wird der Abbau von Proteinen reduziert. Dabei ist es prinzipiell nicht notwendig, dass alle aktiven Zentren des 26S Partikels gehemmt werden. Die Inaktivierung der ChTL-Aktivität reicht aus, um die Abbaurate signifikant zu verringern [Kisselev 2001].

1.2.4 Statine und ihr Einfluss auf das Proteasom

Zu diesem speziellen Thema bietet die Literatur nur eine sehr geringe Zahl publizierter Arbeiten. Diese sind in ihren Ergebnissen widersprüchlich und berichten von einer Hemmung des Proteasoms über keinen nachzuweisenden Effekt bis hin zu einer Aktivitätssteigerung durch Statine. Erstmals wurden im Jahr 1999 Untersuchungen hinsichtlich der Substanzklasse Statine und ihrer Wirkung auf das Proteasom durch Rao und Mitarbeiter veröffentlicht. Sie fanden heraus, dass Lovastatin über eine Hemmung des proteasomalen Systems den Zellzyklus in der G₁-Phase blockiert, wobei die Proteine p21 und p27 stabilisiert werden. Diese Stabilisierung wurde durch die Vorstufenform des Lovastatins, welche ähnlich dem Proteasominhibitor Lactacystin einen geschlossenen β -Laktonring ausbildet, hervorgerufen. Dabei zeigte sich, dass diese Form das eigentliche Zielenzym, die HMG-CoA-Reduktase, nicht hemmte. Weiterhin wurde festgestellt, dass nicht ausschließlich strukturelle Eigenschaften von Lovastatin, sondern auch viele der Wirkungen durch die Vorstufenform mit dem spezifischen Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin übereinstimmten. Lovastatin (Prodrug) hemmte dosisabhängig das Proteasom, wobei mit einer Konzentration von 40 μ M eine halbmaximale Hemmung der über 36 Stunden

behandelten Brustkrebszelllinie erreicht wurde. Mevalonsäure, das Stoffwechselprodukt der HMG-CoA-Reduktase, hob sowohl die durch die Vorstufe induzierte Hemmung des Proteasoms als auch die durch den spezifischen Inhibitor Lactacystin induzierte auf. Sie führte sogar zu einer gesteigerten Peptidaseaktivität des Proteasoms von 300 bis 500 %, wenn die Zellen mit steigenden Konzentrationen an Mevalonsäure vorbehandelt wurden. Diese Aktivierung resultierte in einer Zunahme der Zellteilung [Rao 1999].

Andere Ergebnisse zeigte die Arbeit um die Gruppe von C. Wojcik. Sie konnten Lovastatin und Simvastatin als Modulatoren der aus der Rinderhypophyse gereinigten 20S Proteasomen identifizieren. Ausschließlich durch die Vorstufe der Wirkformen wurde die ChTL-Aktivität leicht stimuliert und die PGPH ihrerseits gehemmt, während die TL-Aktivität unverändert blieb. Die aktive Wirkform von Lovastatin hatte einen geringen inhibitorischen Effekt auf die ChTL-Aktivität. Weiterhin wirkte Mevalonat auf die präparierten 20S Proteasomen leicht inhibitorisch. Die Effekte der beiden CSE-Hemmer auf die proteasomale Aktivität wurden durch Mevalonsäure nicht verändert. Untersuchungen am Zellkulturmodell mit der Kolonkarzinomzelllinie C-26 zeigten bei einer Konzentration von 100 μ M Lovastatin zytotoxische Effekte. Diese konnten bei der Vorstufenform durch eine Zugabe von Mevalonsäure nicht aufgehoben werden. In Zelllysaten wurde nach einer Behandlung eine erhöhte ChTL-Aktivität gemessen. Die beiden anderen proteolytischen Einheiten blieben unbeeinflusst. Die Effekte auf das gereinigte 20S Proteasom korrelierten wenig mit den Ergebnissen, die im Zelllysate gemessen wurden. Dies könnte laut Wojcik seine Ursache darin haben, dass in der vollständigen Zelle das 20S Proteasom mit verschiedenen regulatorischen Einheiten zu dem aktiven 26S Partikel assoziiert ist. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Statine, unabhängig von der HMG-CoA-Reduktase, weitere Ziele in der Zelle besitzen. Auf das proteasomale System bezogen, wurde aus den gewonnenen Daten abgeleitet, dass die untersuchten Statine keinen hemmenden Einfluss aufwiesen [Wojcik 2000].

Ein weiterer Ansatz zu dieser Thematik wurde durch Untersuchungen an differenzierten Neuroblastomzellen geliefert. Die Arbeitsgruppe um Kumar stellte nach einer Behandlung mit Mevastatin degenerative Veränderungen in Form einer Fragmentation der Neuriten an den Zellen sowie eine reduzierte Viabilität der Zellen fest. Im Zellextrakt der differenzierten Neuroblastomzellen konnte Mevastatin dosisabhängig das proteolytische System des Proteasoms inhibieren. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die beobachteten Veränderungen das

Ergebnis einer Proteasomhemmung waren. Pravastatin, welches bereits in der Wirkform verabreicht wurde, zeigte dagegen keine phänotypischen Veränderungen. Sonstige Effekte wurden mit Pravastatin nicht beobachtet. Innerhalb der differenzierten Neuroblastomzellen akkumulierte ausschließlich die geschlossene β -Laktonringstruktur. Daher ging man davon aus, dass die Zellen die auf die HMG-CoA-Reduktase wirksame Form nicht aufnehmen. Dieser Fakt würde auch erklären, warum eine Behandlung mit Pravastatin keine Wirkung zeigte. Die Zugabe von Mevalonsäure verhinderte vollständig die vorher beobachteten degenerativen Veränderungen und verbesserte das Überleben der Zellen. Diese neuroprotektiven Einflüsse ließen sich durch eine verminderte Aufnahme von Mevastatin erklären. Morphologische Veränderungen, die durch Lactacystin induziert wurden, konnten nicht durch Mevalonat aufgehoben werden. Zusammenfassend wurde vorgeschlagen, dass Mevastatin allosterisch an das Proteasom bindet und durch die Präparation abdissoziierte. Möglicherweise werden Aktivatoren des Proteasoms gehemmt oder endogene Inhibitoren aktiviert. Jedenfalls scheint ein anderer Wirkmechanismus vorzuliegen, als bei der durch Lactacystin vermittelten irreversiblen Hemmung [Kumar 2002].

Neuere Erkenntnisse wurden durch die Tätigkeit von Murray *et al.* veröffentlicht. Deren Resultate ergaben sich aus Versuchen an hoch gereinigten 20S Proteasomen, die aus dem Vollblut von Kaninchen gewonnen wurden, und murinen MC3T3-E1 Osteoblasten. Lovastatin stimulierte die ChTL-Aktivität des 20S Proteasoms. Dabei wurde bei einer Behandlung zwischen 0,001 μ M und 5 μ M eine dosisabhängige signifikante Aktivitätssteigerung gemessen. In der Zellkultur stellten sich nach einer einstündigen Inkubation der Präosteoblasten und Osteoblastenzellen mit 1, 5 oder 10 μ M Lovastatin morphologische Veränderungen in Form von Zellabrundung, Ablösung und verringerter Adhäsion dar. Diese phänotypischen Erscheinungen waren durch eine Vorbehandlung mit 20 μ M Mevalonsäure nicht mehr so stark ausgeprägt. Die chymotrypsin-ähnliche Aktivität nahm nach einer 48-stündigen Behandlung der Präosteoblasten mit 1 und 5 μ M Lovastatin bis zum 3,5-fachen bezüglich der Kontrolle zu. Im Gegensatz dazu zeigten die differenzierten Osteoblasten nach einer Inkubation mit 1 μ M Lovastatin über 2 Tage nur eine mäßige Aktivitätserhöhung der ChTL [Murray 2002].

2 Herleitung - Statine und das Proteasom

2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System hat Bedeutung bei der Regulation wichtiger zellphysiologischer Prozesse

Das Proteasom ist ein wichtiger Bestandteil der Zelle. Seine Hemmung hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der lebenden Zelle. Als Konsequenz einer Inhibition wird der Proteinabbau in der Zelle erniedrigt, so dass kurzlebige und langlebige Proteine in der Zelle akkumulieren [Craiu 1996]. Dies wiederum führt in der Zelle zu Veränderungen im Stoffwechsel und der Signaltransduktion.

2.1.1 Zytotoxizität

Verschiedene Faktoren, die bei der Zellteilung eine wichtige Rolle spielen, werden über den proteasomalen Weg abgebaut [Kisselev 2001]. In Studien konnte gezeigt werden, dass in proliferierenden Zelllinien eine Hemmung der proteasomalen Aktivität zu morphologischen und biochemischen Veränderungen führt, die mit dem apoptotischen Zelltod assoziiert sind [Drexler 2000].

2.1.2 Anti-Tumor Effekt

Aufgrund des nachgewiesenen Einflusses auf den Zellzyklus könnten Proteasominhibitoren in der Behandlung proliferativer Erkrankungen eingesetzt werden [Kisselev 2001].

2.1.3 Hemmung der Antigenpräsentation

Das Proteasom hat eine Schlüsselfunktion bei der Immunüberwachung. Durch den Abbau von Proteinen entstehen Peptidreste, die auf der Oberfläche der Zellen über das MHC-I Molekül den zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert werden. Durch eine Verhinderung des Abbaus zytosolischer Proteine führt eine proteasomale Hemmung zu einer verminderten Generation von Peptiden, die über MHC-I-Klasse Moleküle präsentiert werden [Rock 1994].

2.1.4 Antiinflammatorische Aktivität

Bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B spielt das Proteasom eine entscheidende Rolle. Aufgrund eines exogenen Stimulus, beispielsweise eine Entzündungsreaktion im Rahmen einer Reperfusion nach abgelaufener Ischämie [Pye 2003], wird der Transkriptionsregulator aus seinem inaktiven Zustand in den aktiven überführt. Dies geschieht durch den Abbau des gebundenen hemmenden Proteins I κ B [Kisselev 2001]. I κ B wird durch einen I κ B-Kinasekomplex phosphoryliert, wodurch dieses Protein einer Ubiquitinierung zugänglich gemacht wird. Im Anschluss daran wird das polyubiquitinierte Protein rasch durch das Proteasom abgebaut. Dabei wird der Transkriptionsfaktor NF κ B, welcher die Expression der mRNA vieler inflammatorischer Mediatoren und Enzyme induziert, aktiviert und in den Kern transportiert. Dort wird die Transkription der von diesem Faktor abhängigen Proteine eingeleitet. Mittels einer effektiven Proteasominhibition kann die Degradation von I κ B verhindert werden [Gao 2000]. Damit bleibt das inhibitorische Protein stabil im Komplex mit NF κ B gebunden und der Transkriptionsfaktor verbleibt im Zytoplasma. Auf diese Weise könnte Proteasominhibition eine potente antiinflammatorische Funktion ausüben, da der Signalweg wichtiger Entzündungsmediatoren wie TNF und verschiedene Interleukine gehemmt wird [Yeh 2002].

Über die beschriebenen Mechanismen besteht die Möglichkeit, in die Entstehung einer Restenose effektiv einzugreifen. Infolge atherosklerotischer Prozesse bildet sich bei 20 bis 50 % der Patienten, die sich einer Ballondilatation mit Stentimplantation unterziehen mussten, erneut eine Engstelle aus. Da bei der Genese von Stenosen proliferative, entzündliche und apoptotische Prozesse eine entscheidende Rolle spielen, hat die Inhibition des Proteasoms möglicherweise einen günstigen Einfluss auf die Verhinderung einer Restenose. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit spezifischen Proteasominhibitoren die Proliferation glatter Muskelzellen hemmte, die Aktivierung der Entzündungskaskade wurde durch die Stabilisierung von I κ B blockiert und in den Gefäßmuskelzellen wurde Apoptose induziert [Meiners 2002].

2.2 Die antiinflammatorische Wirkung der Statine

Wie bereits dargestellt, greifen die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren vielfältig in atherosklerotische Prozesse ein. Neben den erwähnten Effekten modulieren die Statine ebenfalls die Aktivität von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren, wobei NF κ B ein Schlüsselmediator ist. Durch eine Inhibition der Aktivität von NF κ B werden pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und andere Mediatoren wie COX-2 [Hernandez-Presa 2002] weniger exprimiert [Ortego 1999]. Ähnlich der Proteasomhemmung führte eine Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern in Endothelzellen zur Stabilisierung des zytosolischen Inhibitors I κ B- α [Dichtl 2003]. Damit bleibt NF κ B mit I κ B im Komplex gebunden, so dass der Transkriptionsfaktor in seiner inaktiven Form im Zytosol vorliegt.

PPARs, welches Transkriptionsfaktoren sind, die eine antientzündliche Wirkung zeigen, wurden in ihrer Aktivität pravastatinvermittelt gesteigert [Zelvyte 2001]. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Hemmung von NF κ B und die daraus resultierend vermindert zirkulierenden pro-entzündlichen Moleküle ein sehr gutes therapeutisches Ziel bieten würden. Über diesen Mechanismus kann wirksam in inflammatorische Regelkreise, die auch bei der Entstehung sowie der Progredienz atherosklerotischer Prozesse eine wichtige Rolle spielen, eingegriffen werden.

Wie bereits im einleitenden Teil eingegangen, zeigten Statine durch ihre pleiotrope Wirkungsweise ähnliche Effekte, wie sie nach einer Proteasominhibition beobachtet wurden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen dem spezifischen Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin und den Statinen liegt die Arbeitshypothese nahe, dass die vielfältig eingesetzten CSE-Hemmer über eine Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus wirken könnten [Rao 1999].

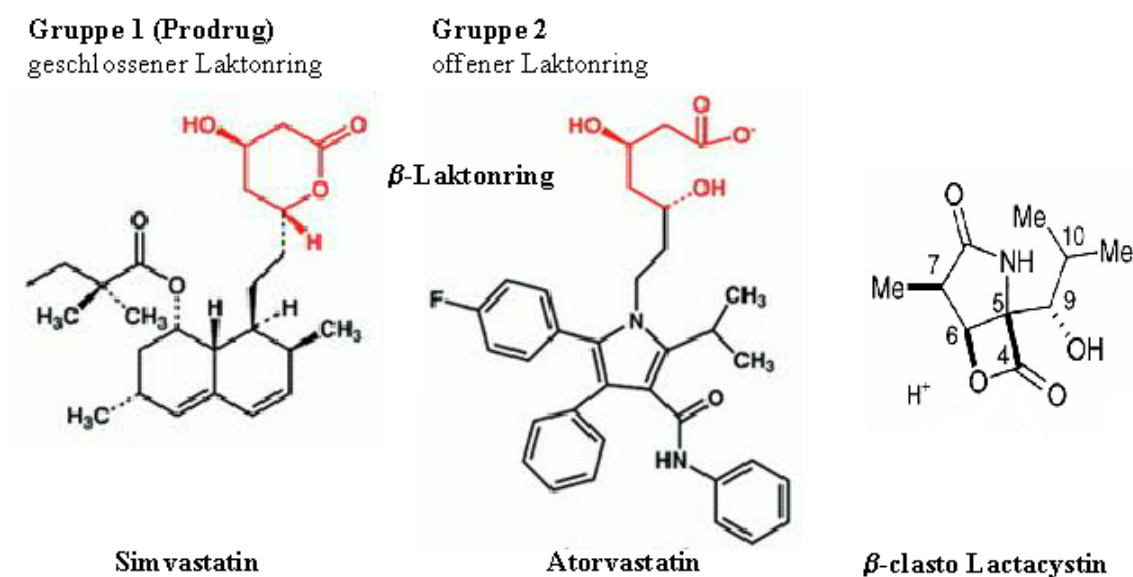


Abb. 5: Strukturvergleich zwischen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und β -clasto Lactacystin. Die strukturelle Parallelität wird anhand der Laktonringe deutlich. Die Esterbindung des Laktonrings von Lactacystin ist entscheidend für die Hemmung des Proteasoms.

2.3 Mechanismus der Proteasominhibition

Das Proteasom besitzt an den β -Untereinheiten N-terminal gelegene Threoninreste als aktive Zentren für die nukleophile Hydrolyse [Kisselev 2001]. Eine intramolekulare Esterbindung im β -Laktonring von β -clasto-Lactacystin wird durch die Hydroxylgruppe von Threonin angegriffen. Dadurch bildet sich eine stabile Esterbindung zwischen der proteolytischen Einheit und dem Inhibitor [Kisselev 2000] aus. Durch die Modifizierung der katalytischen OH-Gruppe durch den β -Laktonring können andere Substrate nicht abgebaut werden.

Durch die Strukturähnlichkeit könnten die Statine mittels dieses Mechanismus das proteolytisch aktive Zentrum des 20S Partikels modifizieren. Dadurch könnten die meisten intrazellulären Proteine nicht mehr gespalten werden und würden im Zytoplasma akkumulieren. Darüber könnten sich die vielzähligen cholesterolumabhängigen Effekte der Statine erklären lassen.

Aus den Überlegungen heraus würden sich weitere Einsatzgebiete der Substanzgruppe erschließen. Weiterhin können sich modellhafte Vorstellungen ergeben, die die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer neu in zelluläre Vorgänge einordnen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Material

- | | |
|---|--------------------------------|
| • DMEM (1000 mg/l Glukose) | Gibco – Invitrogen Corporation |
| • MEM | Gibco – Invitrogen Corporation |
| • Natriumhydrogencarbonat | Merck |
| • Natriumpyruvat | Boehringer Mannheim GmbH |
| • FCS, hitzeinaktiviert bei 57°C | Gibco – Invitrogen Corporation |
| • Penicillin / Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml) | Biochrom AG |
| • PBS | Gibco – Invitrogen Corporation |
| • Trypsin–EDTA | Invitrogen Corporation |
| • Sterilfilter (150 ml easy flow) | Falcon |
| • Zellkulturschalen (Durchmesser: 60 mm, 100 mm) | Falcon – Becton Dickinson |
| • Zellkulturschale (Durchmesser: 150 mm) | Greiner bio-one |
| • Zellkulturflasche (75 mm ²) | Falcon |
| • Hämozytometer (Neubauer–Zählkammer) | Poly Optik |
| • Lichtmikroskop | Leica |
| • Trypan blue (modifiziert) 0,4 % Lösung in PBS | ICN Biomedicals Inc. |

3.1.2 Zusammensetzung der Nährlösungen

3.1.2.1 Nährmedium für VSMC-Zellen und EA.hy926-Zellen

DMEM (1000 mg/l Glukose) + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin

3.1.2.2 *Behandlungsmedium für VSMC-Zellen und EA.hy926-Zellen*

DMEM (1000 mg/l Glukose) + 3 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin

3.1.2.3 *Nährmedium und Behandlungsmedium für CPAE-Zellen*

MEM (1000 mg/l Glukose) + 5 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin

3.1.2.3.1 Herstellung des Behandlungsmediums für CPAE-Zellen

MEM wird in pulverisierter Form zur Verfügung gestellt. Dem Pulver werden 1500 mg NaHCO₃ und 110 mg Natriumpyruvat zugefügt. Die Substanzen werden in 1l *Aqua bidest.* gelöst. Anschließend werden der Lösung 50 ml hitzeinaktiviertes Serum und 10 ml Penicillin / Streptomycin zugegeben. Im Anschluss daran wird die gesamte Lösung steril filtriert.

3.1.3 *Gewinnung von VSMC (Primärkultur) aus der A. carotis der Ratte*

3.1.3.1 *Material*

- | | |
|---|-------------------------|
| • Wistar Ratte (männlich; ca. 60 Tage alt; 300 bis 350 g) | Charles River |
| • Thiopental–Natrium (Trapanal) | Byk Gulden |
| • Präparationsbesteck | |
| • Kollagenase: Worthington Typ II (215 U/mg) | Biochemical Corporation |
| • Zentrifuge (Laborfuge 400 R) | Heraeus Instruments |

3.1.3.2 *Herstellung der Kollagenase*

Zur Herstellung der Kollagenaselösung (Worthington–Collagenase Typ II 215 U/ml) werden 70 mg der pulverisierten Form in 50 ml serumfreiem Nährmedium aufgelöst. Die hergestellte Lösung wird mit einem Einmalfilter steril filtriert, aliquotiert und bei –20°C gelagert.

3.1.3.3 Präparation der glatten Muskelzellen

Dem Versuchstier werden 75 mg des Lokalanästhetikums injiziert und abgewartet, bis sämtliche Reflexe des Tieres erloschen sind. Wenn dies sichergestellt ist, wird die Ratte auf einem Präparationstisch befestigt und mit Alkohol desinfiziert. In Anschluss daran wird der Thorax präpariert und die Halsregion freigelegt. Zu beiden Seiten der Trachea befindet sich die *A. carotis*. Die beiden Gefäße werden aus der bindegewebigen Hülle entfernt. Die präparierten Karotiden werden in eine mit PBS gefüllte 60 mm Zellkulturschale gegeben, worin adhärentes Fettgewebe sowie Bindegewebe entfernt werden. Anschließend werden die Gefäße in etwa 2 bis 3 mm dicke Ringe geschnitten. Die gesamte Präparation wird unter semisterilen Bedingungen durchgeführt.

Nachfolgende Schritte laufen unter sterilen Bedingungen ab. Die Gefäßstücke werden vorsichtig mit einer Pinzette in ein 15 ml Falcon-Gefäß gegeben, mit 300 µl Kollagenase und 50 µl Trypsin–EDTA (im Verhältnis 6:1) versetzt. Die Karotidenstücke werden für 6 Stunden im Brutschrank (Heraeus Instruments), in 90 % wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei 37°C und 5 % CO₂, inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Reaktion mit 5 ml Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet mit Nährmedium resuspendiert und auf eine 60 mm Zellkulturschale pipettiert. Die Zellen werden mit einem Gesamtvolumen von 3,5 ml Nährmedium in standardisierter Atmosphäre kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wird das Medium erneuert. Die Präparation und die Kultivierung der glatten Muskelzellen werden in Anlehnung an die Vorgaben von Chamley-Campbell *et al.* durchgeführt [Chamley-Campbell 1979].

3.1.3.4 Passagieren

Das Nährmedium wird abgesaugt. Anschließend werden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und trypsiniert. Für Experimente werden diese Primärzellen zwischen der Passage 3 und 7 verwendet.

Für Untersuchungen werden die CPAE-Zellen bis Passage 11 verwendet.

3.1.4 Behandlung der Zellen mit CSE-Hemmern und Mevalonsäure

3.1.4.1 Material

- | | |
|--|------------|
| • Behandlungsmedium | Gibco |
| • β -clasto Lactacystin (10 mM Stammlösung in DMSO) | Calbiochem |
| • Simvastatin, β -Laktonring (50 mM Stammlösung in 95 % Ethanol) | Calbiochem |
| • Atorvastatin (50 mM Stammlösung in 100 % DMSO) | Calbiochem |
| • Pravastatin (50 mM Stammlösung in 100 % DMSO) | Calbiochem |
| • D,L – Mevalonsäure (5 M Stammlösung in 95 % Ethanol) | Sigma |

3.1.4.2 Verfahrensweise

Die Zellen werden mit PBS gewaschen, trypsiniert und in definierter Zahl (EA.hy926: $6,5 \times 10^5$ Zellen, CPAE: $1,0 \times 10^6$ Zellen und VSMC: $6,5 \times 10^5$ Zellen) auf 60 mm Zellkulturschalen ausgesät (jeweils Doppelwerte). Zur Adhäsion der Zellen an die Unterlage werden die Kulturschalen unter Standardbedingungen kultiviert (EA.hy926: 24 Stunden, CPAE: 48 Stunden, VSMC: 3 Tage). Nach dieser Zeit werden die EA.hy926-Zellen und die glatten Muskelzellen gründlich mit PBS-Lösung gewaschen und zur Adaptation an das neue Medium über 24 Stunden serumarm weiterkultiviert. Anschließend werden die Zellen bei einer gegebenen Zelldichte von 75 bis 80 % Konfluenz behandelt. Die Zellen erhalten alle in gleicher Weise 2 bzw. 3 ml Medium (48 Stunden):

- | | |
|---|--------------------------------------|
| • Leerwertkontrolle: | Behandlungsmedium |
| • Lösungsmittel: | 0,1 % |
| • Statin: | 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M |
| • Statin mit Mevalonat: | 10 μ M + 400 μ M |
| • Positivkontrolle (β - clasto Lactacystin): | 10 μ M |
| • Mevalonsäure: | 400 μ M, 800 μ M, 1 mM, 5 mM |

Die Zellen werden über 6 bzw. 24 Stunden mit Statinen behandelt oder 24 bzw. 48 Stunden mit Mevalonat.

3.1.5 Färbung mit Trypanblau – Erstellung einer Wachstumskurve

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA trypsiniert. Die Reaktion wird nach einer Reaktionszeit von 1,5 Minuten mit 2 ml Behandlungsmedium gestoppt. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon pipettiert. Von den 3 ml Gesamtvolumen der Suspension werden 20 µl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 20 µl Trypanblau dazu pipettiert. Von dieser Menge werden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und im Anschluss daran die Gesamtzellzahl ermittelt.

Durch ein Anfärben der Zellen mit Trypanblau kann festgestellt werden, ob die Zellen noch eine intakte Zellmembran besitzen. Sobald eine Schädigung der Membran auftritt, kann der Farbstoff ins Zytoplasma eindringen und eine Blaufärbung der Zelle verursachen. Eine nicht mehr funktionstüchtige Zellmembran wird als Marker für avitale Zellen angesehen. Diese Zellen sind noch im Zellverband adhärent.

3.1.6 XTT – Test: Testung der Viabilität nach Behandlung

3.1.6.1 Funktionsprinzip

Bei diesem Test handelt es sich um ein kolorimetrisches Assaysystem. Das gelbe Tetrazoliumsalz XTT wird durch die Zugabe des Elektronenkopplers in metabolisch aktiven Zellen zu dem wasserlöslichen orangefarbenen Formazansalz umgewandelt. Mittels dieser Farbreaktion kann spektrophotometrisch die Lebendigkeit der Zellen quantifiziert werden. Die Absorption des Formazanprodukts wird bei einer Wellenlänge zwischen 450 bis 500 nm und einem Referenzbereich von mehr als 650 nm mit einem ELISA-Reader gemessen.

3.1.6.2 *Material*

- Cell Proliferation Kit (XTT) Roche
XTT-markierte Reagenz
Elektronkopplungslösung
- 96well Mikrotiterplatte (durchsichtig) Greiner bio-one
- ELISA-Reader Anthos HT III

3.1.6.3 *Prozedur*

Die zu untersuchenden Zellen werden auf einer 96well Mikrotiterplatte in einer definierten Zellzahl mit einem Gesamtvolumen von 100 µl pro well ausplattiert. Nach Adhäsion der Zellen werden diese wie unter Punkt 3.1.4 beschrieben mit entsprechenden Konzentrationen der Wirksubstanzen behandelt. Nach Abschluss der Inkubationszeit wird die XTT-Lösung (Endkonzentration: 0,3 mg/ml) zu jeweils 50 µl dazu pipettiert und im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Die Platte wird über einen Zeitraum von 4 Stunden stündlich mit einem ELISA-Reader gemessen.

3.1.7 *Darstellung der Zellen durch Färbung mit Phalloidin und DAPI*

3.1.7.1 *Funktionsprinzip der Färbung*

Zur bildlichen Darstellung morphologischer Besonderheiten nach einer Behandlung der Zellen mit Statinen, eignet sich eine Färbung mit Phalloidin und im Anschluss daran ein Färben der Kernelemente mit DAPI. Phalloidin bindet mit hoher Affinität an Aktinfilamente, die Bestandteil des Zytoskeletts jeder Zelle sind. FITC, sein fluoreszierendes Konjugat, sendet bei 495 nm Licht aus. DAPI wird selektiv an AT-reiche Abschnitte der DNA gebunden, so dass sich die Zellkerne auf diese Weise gut anfärben lassen. Bei einer Wellenlänge von 340 nm bilden sich mit hoher Spezifität fluoreszierende DNA-DAPI-Farbkomplexe aus.

3.1.7.2 *Material*

- | | |
|---------------------------------------|-------|
| • 4 % Paraformaldehyd (Lösung in PBS) | Sigma |
| • 1 % Triton (Lösung in 1 x TBS) | Sigma |
| • Phalloidin (Lösung 1:200 in PBS) | Sigma |
| • DAPI (Lösung 1:1000 in PBS) | Roche |
| • Zeiss-Kamera | Zeiss |
| • Axiovert 3,0 Software | Zeiss |

3.1.7.3 *Färbung mit Phalloidin*

- Zellen 2x vorsichtig mit PBS waschen (je 3 Minuten auf Wippe) → PBS vollständig absaugen
- Zellen 20 Minuten bei RT mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd pro well fixieren
- zweimaliges Waschen in PBS (je 3 Minuten auf Wippe)
- Permeabilisierung der Zellen mit 1 ml 1 % Tritonlösung pro well über 10 Minuten bei RT
- 3x mit PBS waschen
- freie Bindungsstellen mit je 1 ml 1 % FCS (Lösung in PBS) bei RT, 30 Minuten blockieren (auf Wippe)
- zur Färbung der Zellen Inkubation mit 100 µl Phalloidin pro well 37°C (in Alufolie gewickelt)
- 3x mit PBS waschen

3.1.7.4 *DAPI-Kernfärbung*

- Inkubation mit 500 µl/well DAPI-Farbstoff: 15 Minuten, RT (dunkel, in Alufolie gewickelt)
- zweimal gründlich mit PBS waschen (jeweils 3 Minuten auf Wippe)
- Foto mit Zeiss-Kamera und Auswertung mit Axiovert 3,0 Software

3.1.8 Ernte und Lyse der Zellen

Nach der Behandlung werden die Zellen unter einem Lichtmikroskop betrachtet, um phänotypische Veränderungen zu erkennen. Darauf folgend werden die Zellen einer hypotonischen Lyse mit destilliertem Wasser unterzogen.

Zunächst wird das Medium abgesaugt. Dann werden die Zellen zweimalig mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen. Zum Schluss wird die Schale gründlich abgesaugt. Vorsichtig werden 45 bis maximal 80 µl, in Abhängigkeit von der Zelldichte sowie der Zellgröße, eiskaltes *Aqua bidest.* auf die Schalen pipettiert. Die Zellen werden mit einem Zellschaber von der Unterlage abgekratzt. Die Zellsuspension wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und sofort in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gegeben. Ist die Suspension gefroren, wird sie bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Die Proben werden anschließend bei -80°C gelagert bzw. zur Proteinbestimmung weiter aufgearbeitet.

Dazu müssen die Proben bei 4°C, 14000 rpm, über 30 Minuten abzentrifugiert werden (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Dabei trennen sich die intrazytoplasmatischen Proteine sowie auch Kernproteine, im Speziellen natürlich die Proteasomen, von den übrigen Zellbestandteilen ab. Danach wird der vorhandene Überstand in ein gesondertes Eppendorfgefäß pipettiert und das Pellet verworfen.

3.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA)-Assay

3.2.1 Funktionsprinzip der BCA-Proteinbestimmung

Proteine sind in der Lage zweiwertiges Kupfer zu reduzieren. Das bei dieser Reaktion entstehende einwertige Kupfer reagiert mit dem in der Lösung vorhandenen BCA zu einem spezifischen Farbkomplex. Die Absorption des Farbkomplexes wird mittels eines Spektrophotometers gemessen. Dabei korreliert die Farbstoffintensität direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen [Lottspeich 1998].

3.2.2 Material

- Pierce Protein Assay Kit Pierce
BCA Protein Assay Reagenz A
BCA Protein Assay Reagenz B
Albumin Standard (BSA – bovine serum albumin, Fraction V)
- 96well Platte (durchsichtig) Greiner
- ELISA-Reader Anthos HT III

3.2.3 Arbeitsschritte

- Proteinprobe 1:5 mit *Aqua bidest.* verdünnen
- Proteinsuspension auf 96well Platte pipettieren
- zu 1 Teil Probe 20 Teile frische Reaktionsreagenz geben
- Mischung der Nachweisreagenzien Reagenz A (BCA) und B (Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1
- Inkubation des Nachweisansatzes bei 37°C über 30 Minuten
- Messung der Absorption mittels ELISA-Reader, Messfilter 570 nm
- Proteinkonzentration anhand der BSA-Standardkurve in µg/µl mit WinRead 2.1 errechnen

3.3 Messung der Proteasomaktivität mit fluorogenen Substraten

3.3.1 Funktionsweise der fluorogenen Substrate

Diese Substrate werden zur Messung der Aktivität von Peptidasen eingesetzt. Eine kurze Peptidsequenz ist mit dem 7-Amino-4-Methylcoumarin (MCA) konjugiert, welches durch aktive Peptidasen abgespalten wird. Das bei dieser Reaktion entstandene freie, fluoreszierende MCA wird dann mittels eines Spektrofluorometers gemessen. MCA-Substrate sind besonders für Peptidasen geeignet, die substratspezifisch sind. Es bildet sich eine Interaktion zwischen dem Peptidrest des Substrates und der Substratseite des reaktiven Zentrums des Enzyms aus, wobei die Reste des Substrates N-terminal bezüglich der festen Bindung lokalisiert sind. In Abhängigkeit der Proteasomaktivität wird eine definierte Menge an MCA frei, die als Korrelat der Aktivität bewertet wird.

3.3.2 Material

- | | |
|---|-------------------|
| • fluorogene Substrate und MCA-Standard | Bachem |
| SLLVY | |
| BzVGR | |
| ZLLE | Calbiochem |
| • Tris | Roth |
| • Kaliumchlorid (KCl) | Roth |
| • Magnesium-Acetat (Mg-Ac) | Roth |
| • Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck |
| • ATP (Lösung in 100 mM Tris pH 9,5 mit End-pH 7,0) | Roche |
| • Dithiothreitol (DTT) | Sigma |
| • Phosphokreatinkinase (PCK) | Merck |
| • Kreatinphosphat (PC) | Merck |
| • 96well Platte (dunkel) | Greiner bio-one |
| • SpectraMax GeminiEM Microplate Reader | Molecular Devices |

3.3.2.1 Herstellung des 2 x 26S – Inkubationspuffers

- 450 mM Tris-HCl, pH 8,2 (RT)
- 90 mM KCl
- 15 mM Mg-Acetat x 4 H₂O
- 15 mM MgCl₂ x 6 H₂O

3.3.2.2 Ansatz des Mastermixes

- | | |
|--|---------|
| • 2 x 26 S Inkubationspuffer: | 60 µl |
| • <i>Aqua bidest.</i> : | 23,3 µl |
| • DTT (0,5 M Stammlösung): | 0,22 µl |
| • ATP (100 mM Stammlösung): | 6 µl |
| • fluorogenes Substrat (2 mM Stammlösung in DMSO): | 10 µl |
| • PCK (1 U/µl Stammlösung): | 0,2 µl |
| • PC (1 M Stammlösung): | 0,5 µl |

3.3.3 Messung der Proteasomaktivität im Zellextrakt

Für die Bestimmung der Proteasomaktivität im Zellextrakt (Gewinnung der Extrakte siehe Abschnitt Ernte und Lyse), das aus den mit den zu untersuchenden Substanzen behandelten Zellen gewonnen worden ist, werden für die Messung der chymotrypsin-ähnliche Aktivität (ChTL) 10 µg Protein eingesetzt. Für die anderen beiden Aktivitäten, namentlich die caspase-ähnliche (CaspL) und die trypsin-ähnliche (TL), werden dagegen 20 µg Protein verwendet. Insgesamt werden 20 µl Proteinsuspension pro well der 96well Platte angesetzt. Die dem Volumen fehlende Menge wird mit *Aqua bidest.* aufgefüllt. Im Anschluss daran werden jeder Probe 100 µl des vorbereiteten, kühl und lichtgeschützt gelagerten Mastermixes zugegeben. Des Weiteren wird die Platte zur Kontrolle sowie zum Abgleich mit MCA-Standard (Gesamtvolumen von 120 µl) versehen. Die Platte wird sofort abgedeckt und dunkel über einen Zeitraum von 30 Minuten (SLLVY) bzw. 60 Minuten (ZLLE, BzVGR) bei 37°C im Brutschrank

inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird die Platte in einem Fluoreszenzmessgerät, SpectraMax GeminiEM, bei einer Exzitation von 370 nm und einer Emission von 445 nm gemessen. Die Emissionswerte korrelieren mit der relativen Aktivität des Proteasoms. Je höher die Aktivität dieses multikatalytischen Komplexes ist, desto intensiver ist die Fluoreszenz.

Die enzymatische Aktivität wird als prozentuale Aktivität im Vergleich zur Kontrolle berechnet.

3.3.4 Aktivitätsbestimmung am gereinigten 20S Proteasom

3.3.4.1 Material

- 20 S Proteasom, aus Vollblut gereinigt [1 µg/µl] freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von T. Grune zur Verfügung gestellt
- Tris 0,05 M pH 7,2 (RT)
- Wirksubstanzen

Lösungsmittel [0,1 %]

Statine [100 µM] Calbiochem

Mevalonat [400 µM, 800 µM, 1 mM, 5 mM] Sigma

β-clasto Lactacystin [10 µM] Calbiochem

Der Messansatz für die Wirkung der zu testenden Substanzen auf gereinigte 20 S Proteasomen wird in Anlehnung an die Vorgaben von Wojcik *et al.* angesetzt [Wojcik 2000]. Dabei wird 1 µg Proteasom in 0,05 M Trispuffer mit der entsprechenden Wirksubstanz in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Im Anschluss daran wird der Ansatz 150 Minuten bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Nach dem Ende der Reaktionszeit werden die Tripelwerte für die Bestimmung der proteasomalen Aktivität mit dem Reaktionsansatz versehen und gemessen. Die Messung wird wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Die Aktivität wird bezüglich der Lösungsmittelkontrolle bewertet.

3.4 Auswertung und Statistik

Ausgewertet und graphisch zusammengestellt werden die Messergebnisse mit Microsoft Excel. Die Standardabweichungen der einzelnen Versuche sind mit Hilfe von Excel ermittelt. Die statistische Analyse der erhaltenen Daten erfolgt mit dem OneWay ANOVA Test von SigmaStat 2.0. Als statistisch signifikant werden die Werte $P < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Zelluläre Wirkung von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern

Bei der Genese atherosklerotischer Prozesse bieten Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen einen wesentlichen Angriffspunkt. Daher wurden für die Untersuchungen CPAE- und EA.hy926-Zellen als Vertreter endothelialer Zellen sowie glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) verwendet. Zur mikroskopischen Beurteilung der phänotypischen Merkmale wurden die verschiedenen Zelllinien mit den Substanzen Simvastatin (Prodrug), Atorvastatin und Pravastatin behandelt. Simvastatin gehört in dieser Gruppe der Lipidsenker zu den ersten Substanzen. Diese werden bei einer medikamentösen Verabreichung erst in der Leber durch enzymatische Hydrolyse [Istvan 2001] in die aktive Wirkform umgewandelt. Die metabolisch aktive Form hemmt ihr Zielenzym, die HMG-CoA-Reduktase, sehr effektiv. In den Versuchen wurde die Substanz in ihrer Vorstufenform verwendet. Atorvastatin und Pravastatin liegen bereits als aktive Metabolite vor. Sie benötigen daher keine Spaltung des β -Laktonrings, um in die Wirkform überführt zu werden. Auf diese Weise sollten Differenzen sowie Parallelitäten zwischen den einzelnen Wirkformen, der geschlossenen und offenen β -Laktonringform, der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer herausgearbeitet werden.

4.1.1 Phänotypische Merkmale und Veränderungen

Die Behandlung mit den Statinen führte zu mikroskopisch beobachtbaren phänotypischen Veränderungen. Die Zellen wurden länglich. Dabei gab es sichtbare Unterschiede in der Stärke der Ausprägung zwischen den verschiedenen Zelllinien. Die Ausbildung dieses Phänotyps war bei den CPAE-Zellen am deutlichsten. Die Behandlung mit der inaktiven Vorstufe Simvastatin und mit Atorvastatin brachte ähnlich potente Wirkeffekte hervor. Pravastatin zeigte im Vergleich zu Simvastatin und Atorvastatin zeigte deutlich schwächere Effekte.

Die verschiedenen Zellen wurden bei einer 80 %igen Konfluenz mit Konzentrationen von 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 50 μ M des jeweiligen CSE-Hemmers behandelt. Mit steigender Konzentration der Wirksubstanz wurde die Zelldichte stark verringert und degenerative Veränderungen traten auf. Bei hohen Konzentrationen zeigten die Zellen Anzeichen des

Absterbens. Die Zellen verloren ihre längliche Form, wurden rund und lösten sich von der Unterlage ab. Die beschriebenen Merkmale waren nach einer Behandlungsdauer von 6 Stunden mäßig und nach 24 Stunden vollständig ausgeprägt. Im Gegensatz zu den Endothelzellen schienen die glatten Gefäßmuskelzellen nach einer Behandlung über 24 Stunden mit den geringeren Konzentrationen strukturell weniger verändert. Erst ab der hohen Konzentration von 20 μ M zeichneten sich bei den VSMCs deutlich sichtbare Zellveränderungen ab.

4.1.1.1 Behandlung der Endothelzelllinie CPAE mit Statinen

Die mikroskopischen Phänomene sollen anhand der CPAE-Zellen ausführlich dargestellt werden. Die Zellen wurden über 24 Stunden mit Simvastatin (Prodrug) inkubiert. Folgende Effekte ließen sich mikroskopisch beobachten:

- *Ethanol 0,1 %:* Die Zellen waren zu 80 % konfluent. Die Zellen zeigten die normale Form und Größe der Zelllinie. Veränderungen waren nicht erkennbar.
- *1 μ M:* Die Zelldichte war mit der der Lösungsmittelkontrolle vergleichbar. Es zeigten sich erste Zellveränderungen in Form einer Streckung der Zellen.
- *5 μ M:* Die Zelldichte verringerte sich um etwa 20 bis 30 %. Die Zellen lösten sich vermehrt von der Unterlage ab. Die CPAE-Zellen waren länglich.
- *10 μ M:* Eine weitere Verminderung der Konfluenz der Zellen war zu erkennen. Nur noch etwa 55 % der Zellen hafteten fest an. Diese Zellen waren sehr lang gestreckt.
- *20 μ M:* Die Zellen rundeten sich zunehmend und lösten sich ab. Die degenerativen Erscheinungen nahmen weiter zu.
- *50 μ M:* Die meisten Zellen, zwischen 65 bis 75 %, waren abgeschwommen. Die verbliebenen Zellen sahen sehr geschädigt und avital aus.

Mit steigender Konzentration der Vorstufenform Simvastatin nahmen die Zellveränderungen zu. Der Phänotyp der untersuchten Zelllinie hatte sich vollständig verändert. Zu ähnlichen Strukturveränderungen führte die Behandlung mit der offenen Laktonringform Atorvastatin. Diese Effekte waren etwas geringer ausgeprägt. Bei der Behandlung mit Pravastatin waren die beobachteten Merkmale weniger deutlich. Somit lässt sich zusammenfassen, dass 1 μ M Simvastatin im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Substanzen gleicher Konzentration die ursprüngliche Struktur der Zellen stärker veränderte.

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden behandelt. Die bereits beschriebenen Unterschiede und Parallelitäten der verschiedenen Ringformen, der geschlossene β -Laktonring und der offene Ring, der Statine sollten mit Hilfe der Abbildungen belegt werden. Dabei wurde Simvastatin (Abb. 6 a-f) als Vertreter der geschlossenen Ringform und Atorvastatin (Abb. 7 a-f) stellvertretend für die offene Laktonringform verwendet.

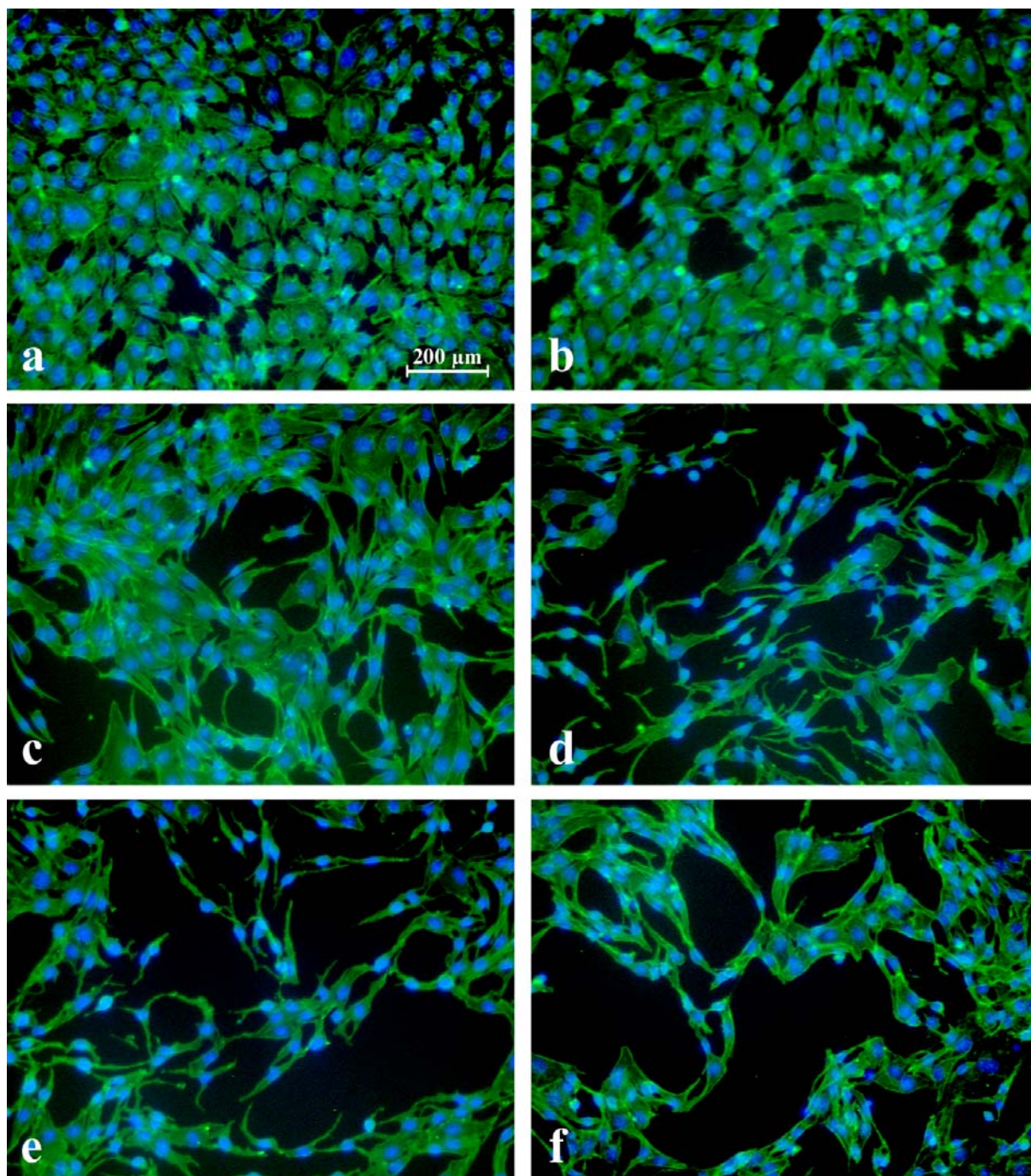


Abb. 6: CPAE-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Simvastatin (geschlossener β -Laktonring):

a) Ethanolkontrolle 0,1 %

b) 1 μ M

c) 5 μ M

d) 10 μ M

e) 20 μ M

f) 50 μ M

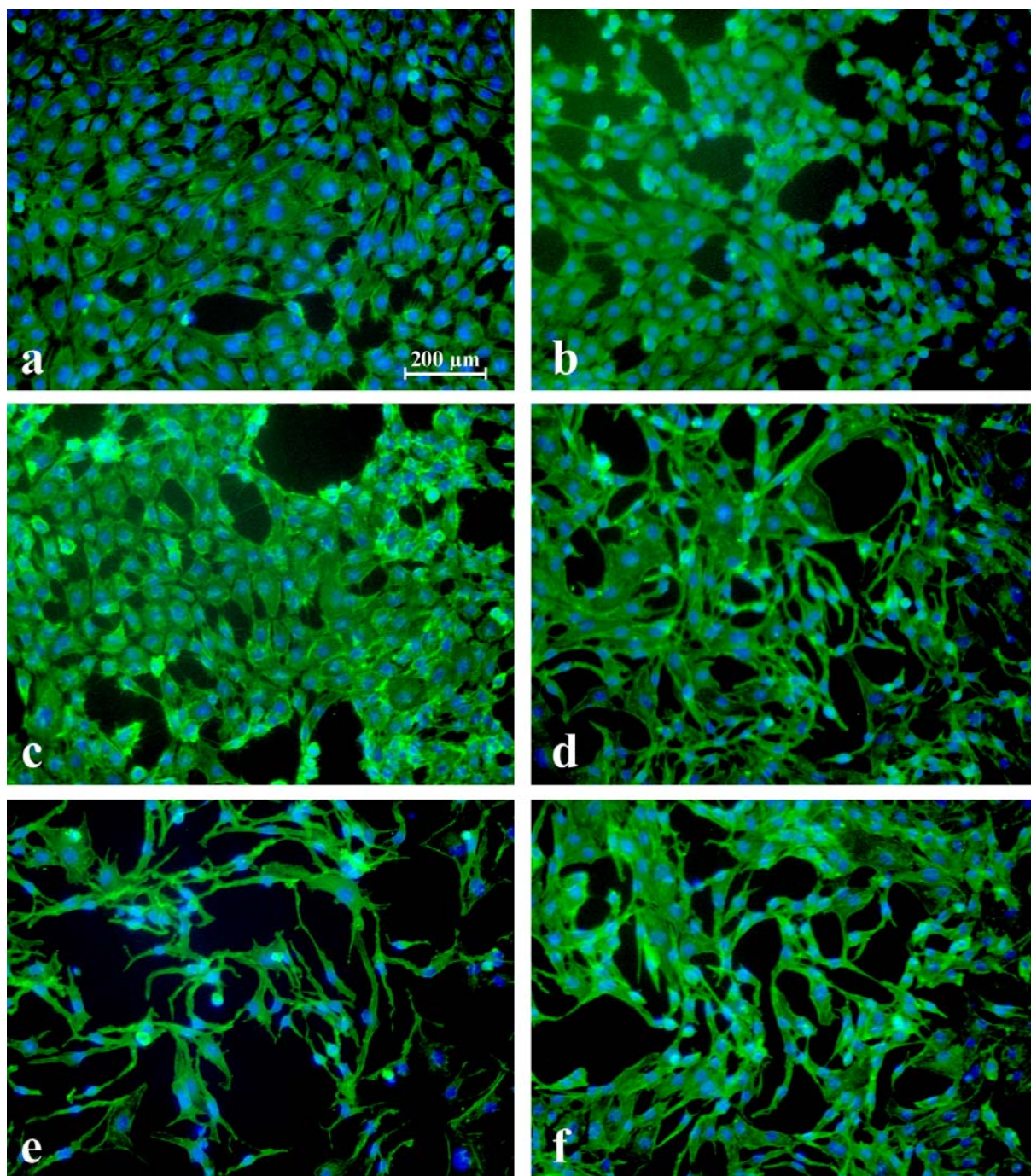


Abb. 7: CPAE-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Atorvastatin (offener β -Laktonring):

a) DMSO-Kontrolle 0,1 %

b) 1 μ M

c) 5 μ M

d) 10 μ M

e) 20 μ M

f) 50 μ M

4.1.1.2 Merkmale einer Behandlung der Zellen mit dem irreversiblen Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin

Die CPAE-Zellen wurden zu diesem Zweck mit 1 μ M und 10 μ M des bekannten Proteasominhibitors β -clasto Lactacystin behandelt. Eine 24-stündige Inkubation der CPAE-Zellen mit einer Konzentration von 1 μ M β -clasto Lactacystin führte zu deutlichen strukturellen Veränderungen. Verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle waren die Zellen lang gestreckt, lösten sich teilweise von der Unterlage ab und waren weniger dicht. Eine Steigerung der Konzentration auf 10 μ M Lactacystin verstärkte die Effekte weiter.

Die mikroskopisch sichtbaren Erscheinungen nach einer Inkubation mit dem Proteasominhibitor und Statinen waren weitgehend vergleichbar. Bei beiden Behandlungen konnten zellschädigende Eigenschaften beobachtet werden. Insgesamt hatte die Gabe von Lactacystin eine potentere Wirkung. Bereits eine Konzentration von 1 μ M Lactacystin genügte, um strukturelle Veränderungen zu erzielen (Abb. 8 e-f).

4.1.1.3 Einfluss der alleinigen Behandlung mit Mevalonsäure und Effekte von Mevalonsäure β -clasto Lactacystin und in Kombination mit Statinen

Die alleinige Behandlung der Zellen mit Konzentrationen zwischen 400 μ M und 5 mM Mevalonsäure verursachte keine auffälligen Veränderungen. Der Phänotyp und die Zelldichte waren mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichbar. Somit hatte Mevalonsäure keinen direkt mikroskopisch verifizierbaren Effekt auf die behandelten Zellen.

Mevalonsäure war nicht in der Lage, die durch Proteasominhibition verursachten degenerativen Veränderungen aufzuheben. Die Zellen behielten ihr gestrecktes Aussehen bei.

Die simultane Gabe von 400 μ M Mevalonat zu 10 μ M Statin führte zu einer vollständigen Aufhebung der statin-induzierten phänotypischen Erscheinungen. Mikroskopisch stimmte der Phänotyp mit dem der Lösungsmittelkontrolle überein. Die unterschiedliche Laktonringform der Statine hatte keinen Einfluss (Abb. 8 a-d). Somit wurde gezeigt, dass die phänotypischen Veränderungen keine Folge der Proteasominhibition waren, sondern auf die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zurückzuführen waren.

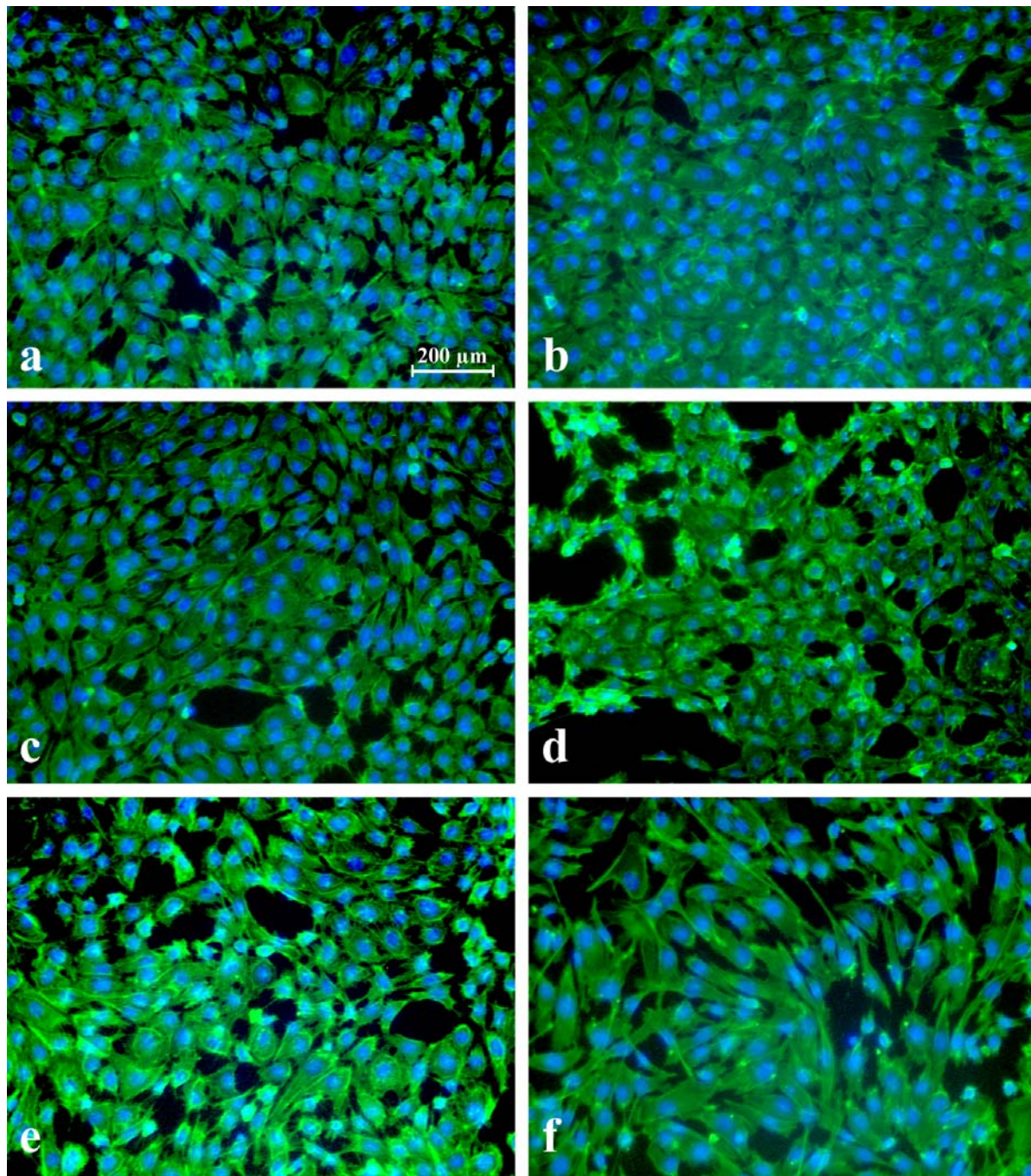


Abb. 8: CPAE-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μ M Statin plus 400 μ M Mevalonsäure und Lactacystin:

- | | |
|--|---|
| a) Lösungsmittel 0,1 % | b) 10 μ M Simvastatin plus 400 μ M Mevalonat |
| c) Lösungsmittel 0,1 % | d) 10 μ M Atorvastatin plus 400 μ M Mevalonat |
| e) 1 μ M β -clasto Lactacystin | f) 10 μ M β -clasto Lactacystin |

Bei der Behandlung der Zellen fiel auf, dass sich die ursprüngliche Form der Zellen veränderte. Die Zellen wurden länglich. Mit Zunahme der Konzentration der Statine zeichnen sich degenerative Veränderungen ab. Mikroskopisch betrachtet sahen die Zellen vital beeinträchtigt aus. Somit war die Testung der Viabilität notwendig.

4.1.2 Einfluss der Statine und die simultane Mevalonsäuregabe auf die Viabilität der CPAE-Zellen

Die konfluenten Zellen wurden über 24 Stunden separat mit den verschiedenen Statinkonzentrationen behandelt. Nach dieser Zeit wurde die metabolische Aktivität als Korrelat der Viabilität mit XTT gemessen.

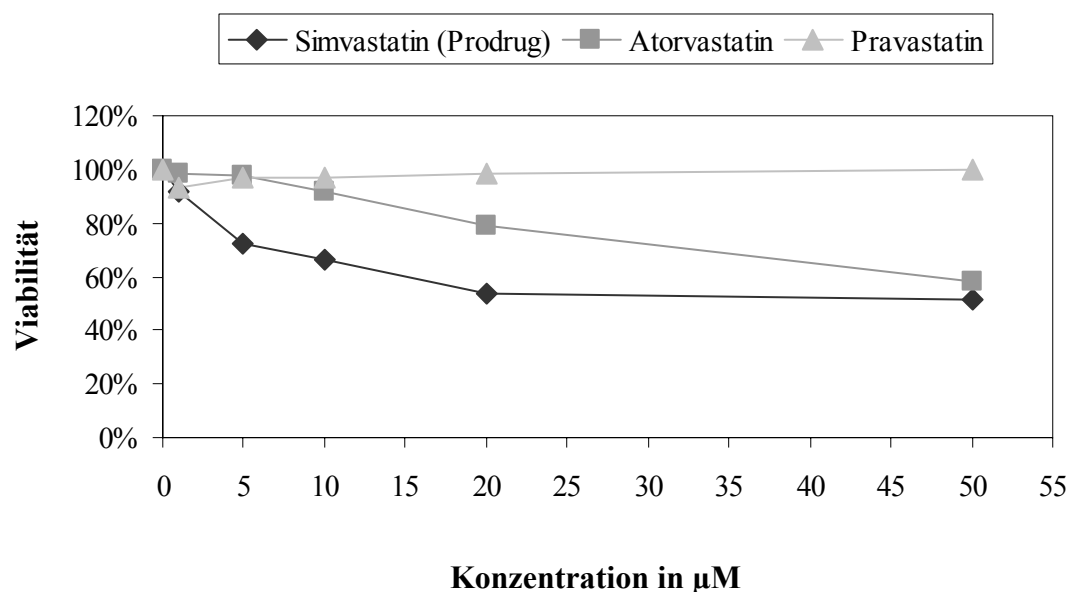


Abb. 9: Effekte von Simvastatin (geschlossener Laktonring), Atorvastatin und Pravastatin (Substanzen mit dem offenen Laktonring) auf die Lebendigkeit der Endothelzelllinie in der Zellkultur. Die Aktivität wurde in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle berechnet. Die Viabilität der CPAE-Zellen wurde durch die 24-Stunden-Inkubation mit Simvastatin und Atorvastatin deutlich beeinträchtigt. Die Stoffwechselaktivität der Zelllinie war nach der Pravastatinbehandlung kaum verändert.

Der Eingriff in den Cholesterolfstoffwechsel der Zellen mit CSE-Hemmern führte zu einer deutlichen Verringerung der Viabilität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Am stärksten beeinträchtigte Simvastatin (Prodrug) die Zellaktivität. Bereits 1 μ M Simvastatin veränderte die Viabilität. Bei der Konzentration von 5 μ M betrug die Viabilität nur noch 75 %. Eine Steigerung der Konzentration auf 20 μ M führte zu einer Aktivitätsverminderung der Zellen auf 55 %. Durch 50 μ M Simvastatin wurde die Stoffwechselaktivität nicht weiter beeinträchtigt. Ähnlich starke Effekte zeigte die Behandlung mit Atorvastatin. Mit steigender Konzentration an Atorvastatin zeigte sich eine Abnahme der Viabilität um etwa 40 %. So ließ sich im Viabilitätsassay die höhere Zytotoxizität einer Behandlung mit Simvastatin (Prodrug) und Atorvastatin objektivieren. Pravastatin hatte kaum Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der CPAE-Zellen.

Tab. 3: Darstellung der Effekte einer simultanen Mevalonsäuregabe auf die Viabilität der CPAE-Zellen im Vergleich zu der alleinigen Inkubation mit 10 μ M Statin. Die Werte wurden bezüglich der Kontrolle errechnet. Die Effekte von Simvastatin (Prodrug) und Atorvastatin auf die Viabilität dieser Endothelzelllinie wurden durch Mevalonat vollständig aufgehoben.

	geschlossener Ring	offener Ring	
	<i>Simvastatin</i>	<i>Atorvastatin</i>	<i>Pravastatin</i>
Lösungsmittelkontrolle	100 %	100 %	100 %
10 μM Statin	66,5 %	91,4 %	97,1 %
plus 400 μM Mevalonsäure	102,0 %	105,3 %	92,3 %

Durch die gleichzeitige Zugabe von 400 μ M Mevalonsäure zu 10 μ M Statin wurden die mikroskopisch beobachteten Statineffekte aufgehoben. Diese Ergebnisse ließen sich auch in der Viabilitätstestung verifizieren. Die Zellen hatten dadurch dieselbe Stoffwechselaktivität wie die Zellen der Lösungsmittelkontrolle. Somit konnte durch Mevalonsäure die reduzierte Stoffwechselaktivität nach alleiniger Statinbehandlung vollständig wiederhergestellt werden.

4.1.3 Vitalität und Wachstum der EA.hy926-Zellen nach 24-Stunden-Behandlung mit Statinen

Die Trypanblau-Färbung der EA.hy926-Zellen diente der Erstellung einer Nettowachstumskurve. Stark geschädigte Zellen, in denen die Zellmembran ihre Barrierefunktion verloren hatte, konnten mit diesem Farbstoff markiert werden. Somit konnten die toten, noch im Zellverband integrierten Zellen identifiziert werden. Nicht mehr adhärente Zellen gingen nicht in die Zählung mit ein. Aus der Anzahl vitaler Zellen konnte die Proliferationsrate während der Behandlung mit Statinen errechnet werden.

Es fiel auf, dass mit steigender Konzentration der Statine die Zahl vitaler Zellen und somit die Proliferationsrate (Abb. 10) der Zellen abnahm. Obwohl die EA.hy926-Zellen in definierter Zahl ausplattiert wurden, veränderte sich die Anzahl der Endothelzellen mit steigender Dosis der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle proliferierten die Zellen nicht mehr so schnell. 1 μM Simvastatin (Prodrug) und 1 μM Pravastatin hatte noch keinen Einfluss auf das Wachstum. Mit 10 μM Simvastatin (Prodrug) war keine Proliferation mehr nachweisbar. Es starben mehr Zellen, als sich teilten. Das Wachstum war bei dieser Simvastatinkonzentration gehemmt. Im Vergleich zu Simvastatin war bereits mit 5 μM Pravastatin das Zellwachstum potent gehemmt. Im Gegensatz dazu zeigte Atorvastatin auch in sehr geringen Dosen eine effektive Verringerung der Proliferation. Durch die Gabe von 1 μM Atorvastatin konnte die Zellproliferation fast vollständig gehemmt werden. Eine weitere Dosissteigerung von Atorvastatin bis auf 10 μM führte zu einer kompletten Inhibition der Zellteilungsrate. Aus diesen Beobachtungen heraus resultierte die Schlussfolgerung, dass Statine in den Wachstumszyklus von Zellen eingreifen. Die niedrigen Konzentrationen zwischen 1 μM und 10 μM Statin waren ausreichend, um das Wachstum deutlich zu limitieren.

Die simultane Gabe von 400 μM Mevalonsäure zu 10 μM Statin konnte den Einfluss auf die Proliferation bei Simvastatin sowie Atorvastatin revertieren. Bei Pravastatin bewirkte die Zugabe von Mevalonat keine Aufhebung der Wachstumsinhibition.

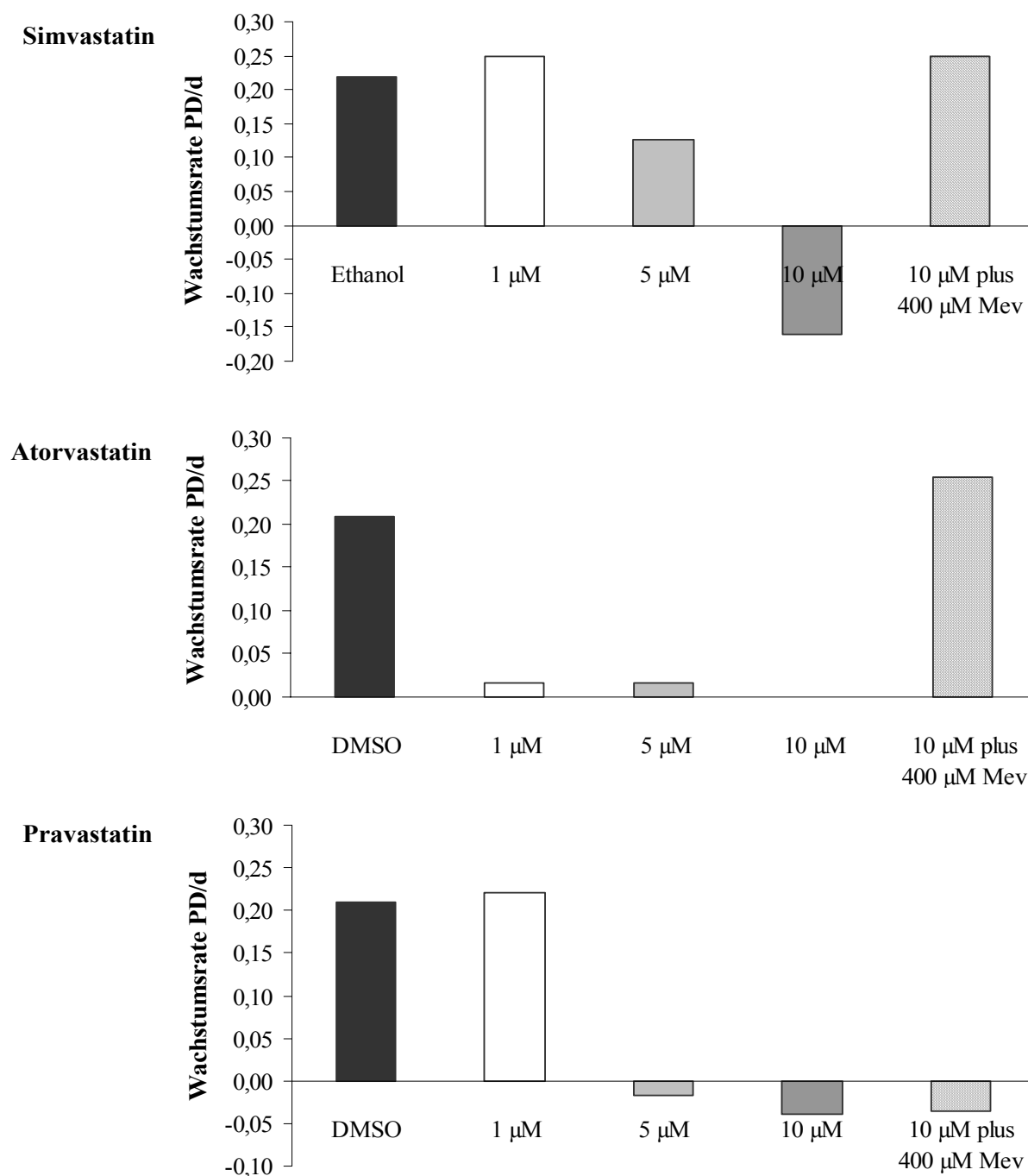


Abb. 10: Nettoproliferation (PD/d: Zellverdopplung pro Tag) der EA.hy926-Zellen während einer 24-stündigen Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern. Durch die Behandlung mit den Statinen sank die Nettowachstumsrate in den EA.hy926-Zellen. Höhere Konzentrationen der Statine führten zu einer Hemmung der Proliferation. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von 400 μM Mevalonat (Mev) zu 10 μM Simvastatin und Atorvastatin aufgehoben werden. Auf die Behandlung mit 10 μM Pravastatin hatte Mevalonsäure keinen Einfluss.

4.2 Der Eingriff in den Cholesterolfstoffwechselweg und seine Effekte auf die Aktivität des Proteasoms

Zur Untersuchung der Statineffekte auf die drei proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms wurden die mikroskopisch ausgewerteten Zelllinien verwendet. Die Proteasomaktivität der beiden Endothelzelllinien wurde nach einer kurzzeitigen 6-Stunden-Behandlung sowie einer 24-Stunden-Behandlung beurteilt. Die proteolytische Aktivität der VSMC-Zellen wurde nur nach einer 24-stündigen Statinbehandlung gemessen. Diese Überlegung begründete sich aus der Tatsache, dass die glatten Muskelzellen eine niedrige Proliferationsrate hatten und eine Kurzzeitbehandlung mikroskopisch keine Wirkung zeigte. Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren inkubiert. Diese Konzentration wurde als optimal herausgefunden, da Konzentrationen über 10 μ M zytotoxisch waren. Die Untersuchung der Proteasomaktivität sollte nicht durch eine Abnahme der Stoffwechselleistung der Zelle aufgrund anderer Statineffekte verfälscht werden. Als Positivkontrolle wurde der bekannte irreversible Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin verwendet. Weiterhin wurde die Wirkung von Mevalonsäure, deren Bildung durch die Statine gehemmt wird, auf die Proteasomaktivität untersucht. In den Versuchen wurde die Wirkung von Mevalonsäure untersucht und die simultane Gabe zu 10 μ M Statin.

4.2.1 Die Wirkung der CSE-Hemmer auf die proteasomale Aktivität vaskulärer Zelllinien

Aus den Untersuchungen resultierte, dass die Statine sowohl bei einer Behandlung über 6 Stunden als auch bei einer Behandlung über 24 Stunden das Proteasom im Vergleich zur Lactacystinkontrolle nicht wirkungsvoll hemmen konnten. Statine hatten in diesem Versuchsaufbau nur einen geringen Einfluss auf den Aktivitätszustand des Proteasoms. Insgesamt lag die Proteasomaktivität nach einer Behandlung mit Statinen bei 100 % \pm 30 %.

Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse sagen aus, dass aus einer Behandlung mit den untersuchten HMG-CoA-Reduktase-Hemmern keine kontinuierliche Hemmung des proteolytischen Zellpartikels resultierte.

Tab. 4: Darstellung der Einflüsse einer Statinbehandlung auf vaskuläre Zellen. In der Zusammenstellung der einzelnen Ergebnisse zeigte sich, dass Statine nur einen minimalen Einfluss auf die Proteasomaktivität hatten. Atorvastatin konnte nach der 6-Stunden-Inkubation in den CPAE-Zellen die TL und nach 24 Stunden die ChTL in den VSMC-Zellen hemmen. Die anderen beiden Substanzen hatten keine Wirkung auf das zelluläre Proteasom.

• **6-Stunden-Behandlung**

	geschlossener Ring	offener Ring	
	<i>Simvastatin</i>	<i>Atorvastatin</i>	<i>Pravastatin</i>
CPAE	↔	TL ↓	↔
EA.hy926	↔	↔	↔

• **24-Stunden-Behandlung**

CPAE	↔	↔	↔
EA.hy926	↔	↔	↔
VSMC	↔	ChTL ↓	↔

Atorvastatin, die offene Laktonringform, hatte einen geringen Einfluss auf die proteasomale Aktivität. Nach einer 6-stündigen Behandlung mit dieser Substanz war die TL in den CPAE-Zellen leicht gehemmt. Nach einer 24-stündigen Inkubation der VSMC-Zellen mit Atorvastatin zeichnete sich eine leicht inhibitorische Wirkung auf die ChTL ab. Die Untersuchung der beiden anderen CSE-Hemmer brachte nicht dasselbe Ergebnis hervor. Simvastatin (Prodrug) und Pravastatin hatten sowohl in der kurzzeitigen wie auch der langzeitigen Behandlung keinen Einfluss auf das Proteasom der untersuchten Zelllinien. Eine Proteasomhemmung im Sinne von β -clasto Lactacystin konnte in den vaskulären Zelllinien nicht oder nicht kontinuierlich nachgewiesen werden.

Im Folgenden sollen die einzelnen Ergebnisse der Untersuchung detaillierter ausgeführt werden.

4.2.1.1 CPAE-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung über 6 Stunden

4.2.1.1.1 Simvastatin (Prodrug)

Eine kurzzeitige Behandlung mit Simvastatin erzeugte keine Inhibition der proteasomalen Aktivität. Alle 3 proteolytisch aktiven Zentren des Kernpartikels zeigten eine leichte Erhöhung ihrer Umsatzrate bezogen auf die Ethanolkontrolle. Am deutlichsten lag die ChTL-Aktivität über dem Niveau der Ethanolkontrolle. Durch die Behandlung mit 1 μM Simvastatin (Prodrug) erreichte die chymotrypsin-ähnliche Aktivität eine Rate von $126,4 \% \pm 10,7$. Durch höhere Konzentrationen sank die Aktivität langsam auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 11A) ab. Da eine Konzentrationssteigerung keine weitere Erhöhung der ChTL-Aktivität hervorrief, ließ sich Simvastatin in dieser Versuchsreihe auch nicht als Aktivator der ChTL-Proteasomaktivität identifizieren ($P=0,08$).

Ähnliche Resultate ergaben sich aus Untersuchungen der caspase-ähnlichen Aktivität (Abb. 11B). Die Aktivität lag bei $109,9 \% \pm 8,3$ nach Gabe von 1 μM , bei $108,7 \% \pm 8,9$ nach einer Dosis von 5 μM und bei einer Endkonzentration von 10 μM bei $103,1 \% \pm 5,7$. Im Durchschnitt lagen die Aktivitätswerte der CaspL auf dem Level der Lösungsmittelkontrolle ($P=0,303$). Simvastatin hatte keinen Einfluss auf diese proteasomale Aktivität.

Auch die trypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms lag nach einer geringen Dosis von 1 μM mit $111,6 \% \pm 10,6$ geringfügig über der Aktivität der Kontrolle. Mit zunehmender Dosis an Simvastatin verringerte sich die Aktivität auf das Aktivitätsniveau der Kontrollzellen ($P=0,636$). Auch anhand dieser Resultate wird deutlich, dass Simvastatin keinen direkten Einfluss auf die trypsin-ähnliche Aktivität hatte (Abb. 11C).

Zum direkten Vergleich sollten den Resultaten einer Statinbehandlung die Ergebnisse einer Behandlung mit dem bekannten irreversiblen Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin gegenübergestellt werden. Eine kurzzeitige Behandlung mit Lactacystin führte zu einer effektiven Hemmung der Proteasomaktivität. Wie erwartet war die ChTL-Aktivität mit einer Restaktivität von $4,2 \% \pm 0,8$ ($P<0,001$) am stärksten gehemmt. Die anderen beiden Aktivitäten, die CaspL und die TL, hatten jeweils eine höhere Restaktivität. Die CaspL-Aktivität sank auf $57,3 \% \pm 2,9$ ($P=0,002$). Die TL-Aktivität war bis auf eine relative Aktivität von $28,3 \% \pm 1,4$ ($P<0,001$) gehemmt.

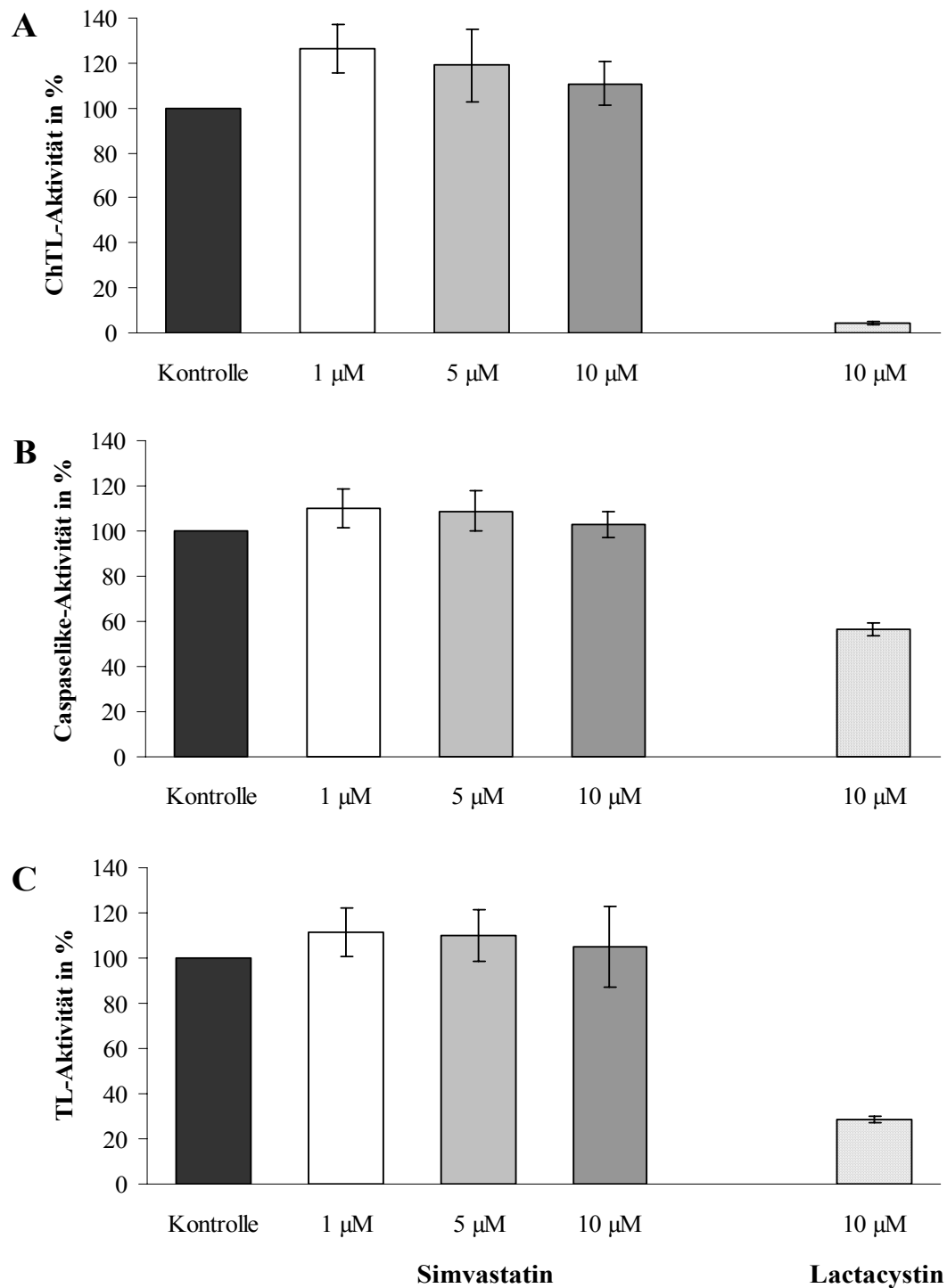


Abb. 11: Proteasomaktivität der CPAE-Zellen nach einer 6-Stunden-Inkubation mit Simvastatin (Prodrug) und 10 µM β -clasto Lactacystin. Im Gegensatz zum bekannten Proteasomhemmer Lactacystin konnte durch Simvastatin das Proteasom nicht gehemmt werden. Simvastatin hatte in der kurzzeitigen Behandlung keinen Einfluss auf das Proteasom dieser Endothelzelllinie. Die Proteasomaktivität war nicht signifikant verändert.

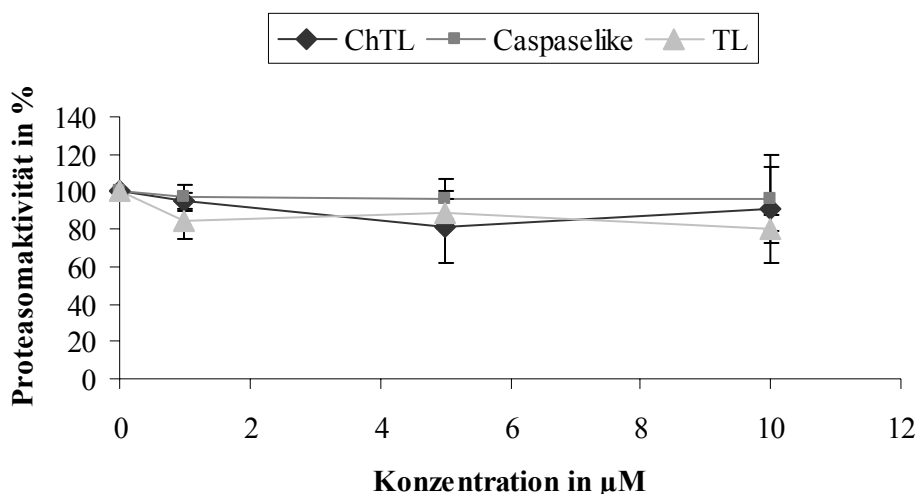
4.2.1.1.2 Atorvastatin

Abb. 12: Dosis-Wirkungskurve einer 6-stündigen Inkubation der CPAE-Zellen mit Atorvastatin. Atorvastatin verursachte eine leichte Hemmung der TL-Aktivität. Die anderen beiden proteasomalen Untereinheiten wurden nicht signifikant verändert. Die Aktivität der ChTL und der CaspL wurden durch Atorvastatin nicht signifikant beeinflusst. Die Aktivität lag auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle.

Nach einer 6-stündigen Behandlung der CPAE-Zellen mit Atorvastatin konnte die TL-Aktivität konzentrationsabhängig um 20 % gehemmt werden ($P=0,046$). Mit 1 μM Atorvastatin sank die TL-Aktivität auf $84,9 \% \pm 9,9$ ab. Bei der Endkonzentration von 10 μM Atorvastatin betrug die TL-Aktivität noch $80,5 \% \pm 9,4$. Verglichen mit einer Behandlung mit 10 μM β -clasto Lactacystin (verbleibende TL-Aktivität von $28,3 \% \pm 1,4$) war diese Inhibition gering.

Auf die beiden anderen Aktivitäten, die ChTL ($P=0,178$) und die CaspL ($P=0,966$), hatte Atorvastatin keinen Einfluss. 1 μM Atorvastatin beeinträchtigte die ChTL-Aktivität sowie die caspase-ähnliche Aktivität nicht. Die gemessenen Aktivitäten lagen bei $95,2 \% \pm 4,1$ für ChTL und bei $96,7 \% \pm 7,2$ für die CaspL-Aktivität. Eine Steigerung der Konzentration auf 5 μM dieses CSE-Inhibitors senkte die chymotrypsin-ähnliche Aktivität auf $81,1 \% \pm 19,5$ und die caspase-ähnliche Aktivität auf $96,3 \% \pm 10,7$. Durch die Zugabe von 10 μM der Wirksubstanz veränderte sich die Aktivität von ChTL geringfügig auf $90,9 \% \pm 29,2$. Die CaspL wurde bei dieser Konzentration in ihrer Aktivität nicht verändert.

Anhand der Ergebnisse konnte hergeleitet werden, dass die 6-Stunden-Behandlung mit Atorvastatin die trypsin-ähnliche Aktivität leicht hemmte.

4.2.1.1.3 Pravastatin

Nach einer 6-stündigen Behandlung mit Pravastatin zeichneten sich keine Aktivitätsveränderungen ab. Pravastatin ist kein Inhibitor des zellulären Proteasoms.

1 μ M Pravastatin hatte auf die ChTL (Abb. 13A) und die caspase-ähnlichen Aktivität (Abb. 13B) keinen Einfluss. Die Proteasomaktivität lag auf dem Niveau der DMSO-Kontrolle. Mit einer Erhöhung der Pravastatinkonzentration auf 5 μ M sank die ChTL leicht auf $85,9 \% \pm 30,2$ ab. Bei der Konzentration von 10 μ M Pravastatin hatte das Proteasom eine ChTL-Aktivität von $93,0 \% \pm 33,3$ ($P=0,868$). Die CaspL-Aktivität wurde durch die Gabe von höheren Dosen Pravastatin nicht beeinflusst ($P=0,821$). 1 μ M Pravastatin verursachte bei der trypsin-ähnlichen Aktivität eine Aktivitätssenkung von 19 % auf $80,9 \% \pm 10,4$. Bei einer Dosiserhöhung auf 5 μ M blieb dieser verringerte Aktivitätszustand erhalten. Nach der Inkubation mit 10 μ M Pravastatin hatte die TL eine mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichbare Aktivität (Abb. 13C). Anhand der statischen Auswertung ließ sich ablesen, dass Pravastatin die TL nicht signifikant hemmen konnte ($P=0,095$).

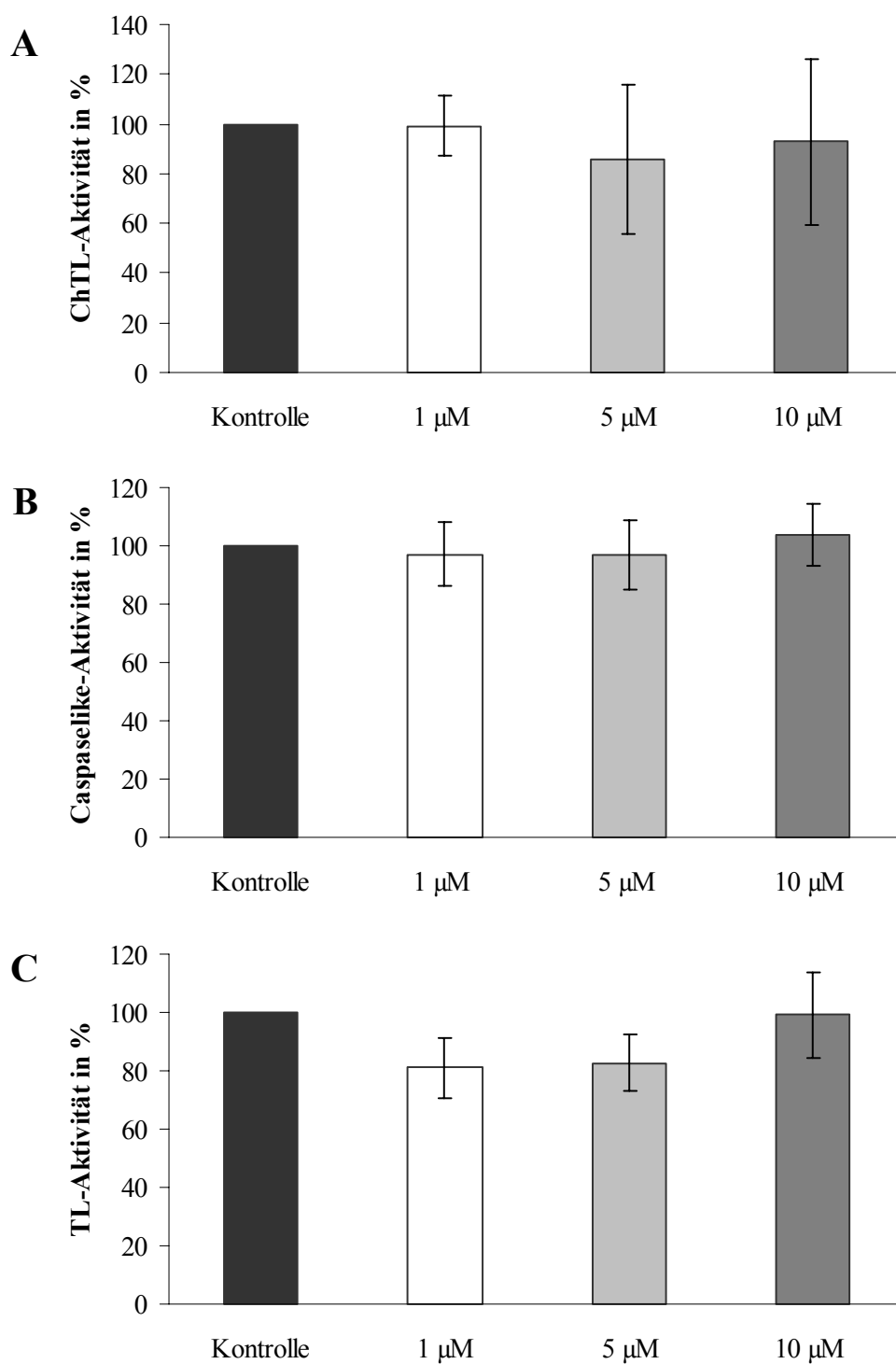


Abb. 13: Proteasomaktivität der CPAE-Zellen nach einer 6-Stunden-Behandlung mit Pravastatin. Pravastatin konnte in dieser Endothelzelllinie keine Hemmung der Proteasomaktivität erzeugen. Mit steigender Konzentration an Pravastatin veränderten sich die einzelnen proteolytischen Einheiten nicht signifikant. Pravastatin hatte somit keinen direkten Effekt auf die Proteasomaktivität.

4.2.1.1.4 Einfluss von Mevalonsäure in Kombination mit Statinen auf die Proteasomaktivität

In der Arbeit von Rao *et al.* konnte gezeigt werden, dass Mevalonat die hemmenden Effekte der CSE-Inhibitoren auf das Proteasom aufhob. Diese Untersuchungsergebnisse wurden so erklärt, dass Mevalonat die Proteasomaktivität induziert [Rao 1999].

Tab. 5: Tabellarisch dargestellt ist die Proteasomaktivität der CPAE-Zellen nach einer 6-stündigen Behandlung mit 10 μ M Statin und 400 μ M Mevalonsäure. Die Proteasomaktivität wurde der Aktivität nach alleiniger Inkubation mit 10 μ M Statin gegenübergestellt. Alle Aktivitätswerte wurden bezüglich der Lösungsmittelkontrolle ausgewertet. Die Aktivität lag vergleichbar auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Die gleichzeitige Gabe von Mevalonsäure blieb ohne Einfluss auf die Proteasomaktivität.

Lösungsmittel			10 μ M Statin	
				plus 400 μ M Mevalonat
<i>Simvastatin</i> (Prodrug)	ChTL		110,6 % \pm 9,7	81,0 % \pm 27,5
	CaspL	100 %	103,1 % \pm 5,7	86,4 % \pm 20,3
	TL		105,1 % \pm 17,9	95,3 % \pm 8,7
<i>Atorvastatin</i>	ChTL		90,9 % \pm 29,0	95,5 % \pm 4,8
	CaspL	100 %	96,2 % \pm 17,0	95,4 % \pm 4,0
	TL		80,5 % \pm 7,0	96,1 % \pm 8,7
<i>Pravastatin</i>	ChTL		93,0 % \pm 33,0	90,8 % \pm 20,3
	CaspL	100 %	103,6 % \pm 10,0	93,0 % \pm 14,9
	TL		99,0 % \pm 14,8	95,4 % \pm 2,9

Die verringerte TL-Aktivität nach Atorvastatinbehandlung lag nach Mevalonsäuregabe wieder auf dem Niveau der Kontrolle. Bei der simultanen Gabe zu Simvastatin (Prodrug) wurde eine geringere proteasomale Aktivität im Vergleich zu einer alleinigen Simvastatinbehandlung gemessen. Die Zugabe von Mevalonsäure zu Pravastatin führte zu keiner Veränderung der proteasomalen Aktivität.

Somit konnten in den eigenen Experimenten keine modulatorischen Effekte bei einer simultanen Gabe von 400 μ M Mevalonat zu 10 μ M Statin beobachtet werden. Alle 3 proteolytisch aktiven Zentren blieben unbeeinflusst.

In den CPAE-Zellen konnten die pleiotropen Veränderungen einer effektiven Statinbehandlung durch die Zugabe von 400 μ M Mevalonsäure aufgehoben werden. Diese Resultate ließen sich nicht auf die Aktivitätssteigerung des Proteasoms nach Mevalonatgabe zurückführen. Effekte, die die proteasomale Aktivität modulieren, konnten diese Wirkung von Mevalonat auf die Strukturveränderungen durch Statine nicht erklären.

4.2.1.2 EA.hy926-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung über 6 Stunden

Bei der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 zeichneten sich ähnliche Ergebnisse ab, die bereits ausführlich anhand der CPAE-Zellen beschrieben wurden. Die gemessene proteasomale Aktivität nach Statingabe lag im Durchschnitt auf dem Niveau der Kontrolle.

Die Inkubation mit Simvastatin (Prodrug) ergab keine signifikanten Veränderungen der proteasomalen Aktivität. Die Aktivität aller proteolytischen Einheiten blieb mit 100 % \pm 10 auf dem Niveau der Kontrolle. Dieselben Resultate wurden nach einer Behandlung der Zellen mit Atorvastatin erzielt. Auch Pravastatin hatte keinen Einfluss auf das zelluläre Proteasom der EA.hy926-Zellen.

Durch die Behandlung mit 1 μ M Pravastatin wurde die ChTL auf 78,7 % \pm 16,7 verringert. Mit der Konzentration von 5 μ M wurde keine weitere Aktivitätsminderung erzielt. Nach einer weiteren Erhöhung auf 10 μ M Pravastatin nahm die ChTL-Aktivität wieder zu und ging auf das Niveau der Kontrolle zurück ($P=0,783$). Die Aktivität der CaspL-Einheit blieb unverändert auf dem Niveau der Kontrolle ($P=0,912$). 1 μ M dieses Statins erhöhte die TL-Aktivität um 13 % auf

113,2 % \pm 28,6. Mit 10 μ M Pravastatin hatte die TL eine Aktivität von 118 % \pm 32,5 ($P=0,400$). Aufgrund der statischen Auswertung konnten die gemessenen Aktivitätsänderungen der TL nicht als proteasommodulatorische Effekte interpretiert werden.

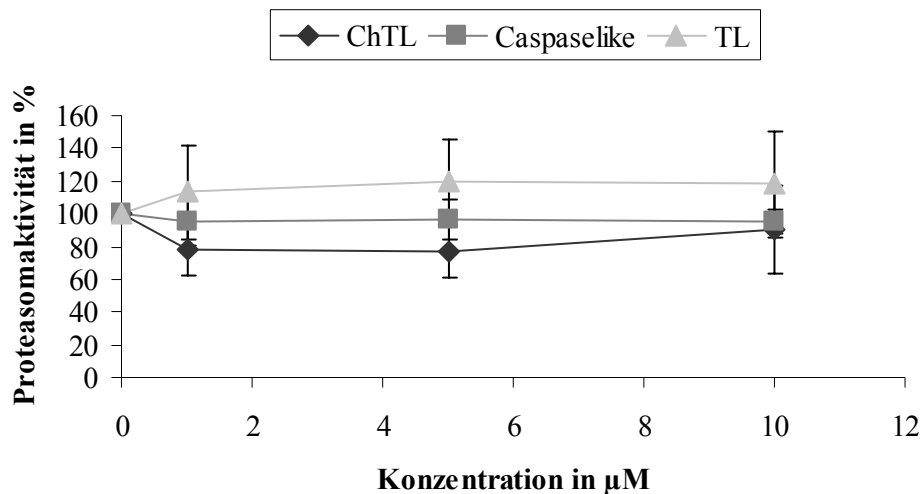


Abb. 14: Dosis-Wirkungskurve einer 6-Stunden-Behandlung der EA.hy926-Zellen mit Pravastatin. Am Beispiel von Pravastatin sollten die Effekte der Statinbehandlung graphisch dargestellt werden. Bei der Behandlung dieser humanen Endothelzelllinie zeigten sich keine signifikanten konzentrationsabhängigen Veränderungen der Proteasomaktivität. Die Statine hatte keinen Einfluss auf die proteolytische Funktion des Proteasoms der EA.hy926-Zellen.

Im Vergleich zu dem bekannten Proteasominhibitor Lactacystin konnten die Statine die Aktivität des Proteasoms nicht hemmen. Nach einer 6-Stunden-Behandlung mit Lactacystin lag die ChTL bei 13,6 % \pm 0,1 ($P<0,001$), die CaspL bei 84,3 % \pm 5,4 ($P=0,054$) und die TL bei 51,3 % \pm 8,8 ($P=0,016$).

Die Zugabe von 400 μ M Mevalonsäure zu 10 μ M Statin zeigte keinen Unterschied in den Untersuchungen der EA.hy926-Zellen zu den bereits beschriebenen Effekten in den CPAE-Zellen.

4.2.1.3 CPAE-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung über 24 Stunden

4.2.1.3.1 Simvastatin (Prodrug)

Tab. 6: Proteasomaktivität nach einer 24-Stunden-Behandlung der CPAE-Zellen mit Simvastatin (Prodrug) und β -clasto Lactacystin. Durch die Gabe von Simvastatin konnte im Gegensatz zu Lactacystin keine signifikante Hemmung der Proteasomaktivität erzeugt werden. Die Inkubation mit Simvastatin (Prodrug) blieb ohne direkten Effekt auf die proteasomale Aktivität dieser Endothelzellen.

		Simvastatin			Lactacystin
	Kontrolle	1 μ M	5 μ M	10 μ M	10 μ M
<i>ChTL</i>		90,6 % \pm 21,2	80,7 % \pm 6,0	66,4 % \pm 2,7	29,0 % \pm 0,9
<i>CaspL</i>	100 %	99,0 % \pm 11,9	99,8 % \pm 10,8	93,0 % \pm 11,7	96,0 % \pm 4,6
<i>TL</i>		95,6 % \pm 16,0	108,2 % \pm 18,4	97,9 % \pm 6,8	64,5 % \pm 4,1

Die 24-Stunden-Behandlung der CPAE-Zellen mit Simvastatin (Prodrug) konnte die ChTL-Aktivität scheinbar konzentrationsabhängig verändern. 1 μ M Simvastatin brachte noch keine Veränderungen. Durch 5 μ M sank die ChTL-Aktivität in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle um 20 % auf einen Aktivitätswert von 80 %. Eine Erhöhung der Simvastatindosis auf 10 μ M führte zu einer weiteren Abnahme dieser proteolytischen Einheit des Proteasoms. Die behandelten Zellen noch eine ChTL-Aktivität von 66 %. In der statistischen Auswertung zeigte sich jedoch, dass diese Aktivitätsminderung der ChTL nicht als signifikant zu bewerten war ($P=0,089$). Somit hatte Simvastatin (Prodrug) keinen Einfluss auf die ChTL-Aktivität.

Im Vergleich dazu zeigte sich mit dem bekannten Lactacystin nach einer 24-stündigen Behandlung wie erwartet ein stark inhibitorischer Effekt ($P<0,001$).

Die beiden anderen proteolytischen Einheiten wurden durch die 24-Stunden-Inkubation mit Simvastatin in ihrem Aktivitätszustand nicht verändert. Hier blieb in allen Konzentrationen die Aktivität im Bereich der Lösungsmittelkontrolle (CaspL ($P=0,802$) und die TL ($P=0,785$)). β -clasto Lactacystin, der bekannte Proteasominhibitor, zeigte im Vergleich zu dem CSE-Hemmer eine echte Inhibition sowohl der ChTL- ($P<0,001$) wie auch der TL-Aktivität ($P=0,007$). Eine

Hemmung der CaspL-Aktivität war nach einer 24-Stunden-Behandlung der CPAE-Zellen mit Lactacystin nicht zu messen ($P=0,339$). Die Aktivität lag auf dem Level der Lösungsmittelkontrolle.

Simvastatin (Prodrug) hatte auch nach einer Langzeitbehandlung keinen Effekt auf die Funktion des Proteasoms in den CPAE-Zellen.

4.2.1.3.2 Atorvastatin

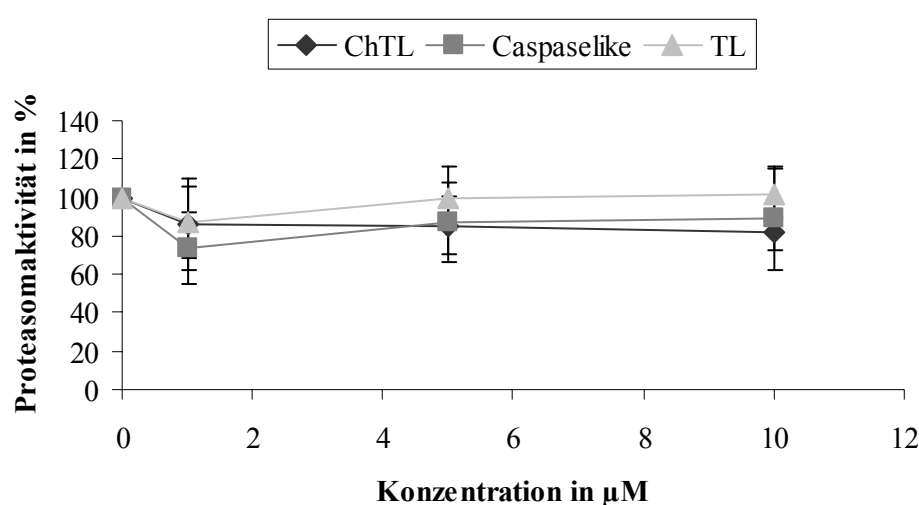


Abb. 15: Dosis-Wirkungskurve der CPAE-Zellen nach der Inkubation mit Atorvastatin über 24 Stunden. Die Aktivität des zellulären Proteasoms war durch die Gabe verschiedener Konzentrationen Atorvastatin kaum verändert. Mit 1 μM Atorvastatin konnte ein leichtes Absinken der proteolytischen Aktivität gemessen werden. Mit der Steigerung der Dosis setzte sich dieser Effekt nicht fort. Atorvastatin konnte in der Langzeitbehandlung das Proteasom nicht signifikant hemmen.

Aus den Messungen ging hervor, dass die ChTL, mit steigender Dosis nicht effektiv verringert werden konnte ($P=0,486$). Es zeigte sich zwar, dass mit einer Endkonzentration von 10 μM Atorvastatin die Aktivität dieser Einheit um 18,4 % auf 81,6 % \pm 8,6 vermindert war. Dieser Effekt konnte in der statistischen Auswertung nicht als signifikant erkannt werden. Die caspase-ähnliche Aktivität hatte bei einer Konzentration von 1 μM dieses HMG-CoA-Reduktase-Hemmers nur eine Aktivität von 73,3 % \pm 18,5. Mit einer Steigerung der Atorvastatindosis nahm

die Aktivität jedoch nicht weiter ab. Im Gegenteil, die Aktivität stieg auf Werte an, die mit der Kontrolle vergleichbar waren ($P=0,340$). Die TL-Aktivität wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst ($P=0,355$).

Eine 24-stündige Behandlung mit Atorvastatin zeigte keine Wirkung auf die Proteasomaktivität der CPAE-Zellen. Im Vergleich zu einer 6-stündigen Inkubation konnte die TL-Aktivität durch diese Substanz nicht verringert werden. Atorvastatin war in dieser Versuchsreihe nicht als TL-Inhibitor zu identifizieren.

4.2.1.3.3 Pravastatin

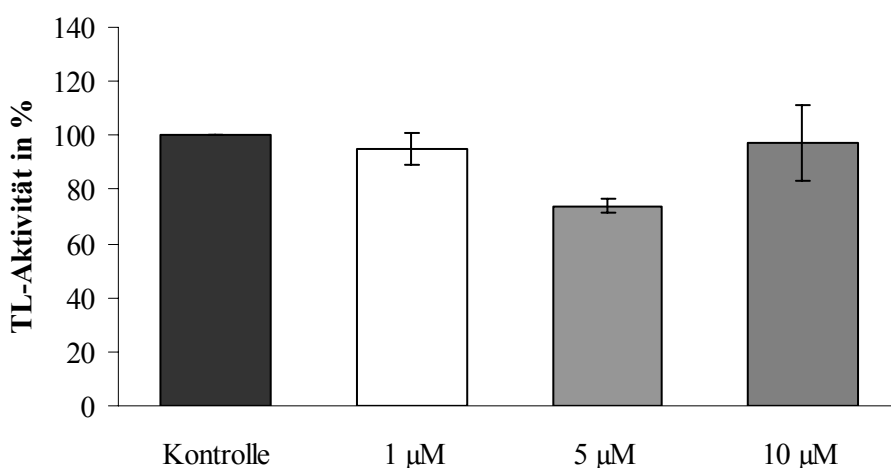


Abb. 16: Aktivitätsgraph der TL nach einer 24-Stunden-Inkubation der CPAE-Zellen mit Pravastatin. 1 µM Pravastatin hatte keine Wirkung auf die Proteasomaktivität. Durch die Konzentration von 5 µM Pravastatin konnte die TL-Aktivität leicht gehemmt werden. Mit 10 µM Pravastatin ging die TL-Aktivität wieder auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Pravastatin hatte keinen konzentrationsabhängigen signifikanten Einfluss auf die Proteasomaktivität.

Die 24-Stunden-Behandlung mit Pravastatin hatte einen geringen Effekt auf die Aktivität des Proteasoms. Ausschließlich die Dosis von 5 µM Pravastatin konnte die proteolytische TL-Aktivität leicht um $25,2 \% \pm 2,6$ inhibieren ($P=0,046$). Die Gabe von 1 µM und 10 µM Pravastatin konnten keine Hemmung der TL erzeugen. Somit konnte Pravastatin die TL-Aktivität nicht hemmen (Abb. 16). Ähnliche Ergebnisse zeichneten sich auch bei der Messung

der beiden anderen proteolytischen Untereinheiten ab. Die chymotrypsin-ähnliche Einheit wurde durch das Einwirken von Pravastatin leicht beeinflusst. 10 μ M Pravastatin verringerten die Aktivität auf $87,7 \% \pm 17,9$ bezüglich der Kontrolle. Diese kontinuierlich sinkende Aktivität konnte nicht als hemmender Effekt betrachtet werden ($P=0,768$). Die CaspL-Aktivität wurde durch die Gabe von Pravastatin nicht berührt. Es zeigten sich Aktivitätswerte, die mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichbar waren ($P=0,800$). Die Ergebnisse machten deutlich, dass Pravastatin nach der Inkubation über 24 Stunden keine Wirkung auf das Proteasom der CPAE-Zellen hatte.

4.2.1.3.4 Einfluss einer simultanen Gabe von Mevalonsäure auf die Proteasomaktivität

Die simultane Gabe von 400 μ M Mevalonat zu 10 μ M Statin hatte keinen aktivierenden Effekt auf die proteasomale Aktivität. Mevalonsäure konnte in diesem Versuchsansatz nicht als Modulator der Proteasomaktivität identifiziert werden.

In Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle wurde die proteasomale Aktivität durch die gleichzeitige Gabe von Mevalonat und Statin nicht verändert. Alle 3 proteolytischen Untereinheiten hielten sich auf dem Aktivitätsniveau der Kontrollzellen. Auch der Vergleich der unterschiedlichen Statine zeigte keine Differenzen.

Summa summarum konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die zellulären Veränderungen nach einer simultanen Mevalonatgabe nicht aus einer Modulation der Proteasomaktivität resultierten. Die Aktivierung oder die Wiederherstellung der proteasomalen Aktivität konnte nicht die Ursache der Aufhebung der pleiotropen Wirkung der Statine durch Mevalonsäure sein.

Tab. 7: Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Proteasomaktivität der CPAE-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit der gleichzeitigen Gabe von 400 μM Mevalonat und 10 μM Statin sowie der alleinigen 10 μM Statinbehandlung. Bezüglich der alleinigen Statinbehandlung zeichneten sich keine Veränderungen ab. Die simultane Mevalonsäuregabe hatte keinen Einfluss auf die Proteasomaktivität.

Lösungsmittel			10 μM Statin	
				plus 400 μM Mevalonsäure
<i>Simvastatin</i>	ChTL		66,4 % \pm 2,7	98,8 % \pm 25,5
	CaspL	100 %	93,1 % \pm 11,7	98,3 % \pm 11,6
	TL		97,9 % \pm 6,7	97,6 % \pm 5,8
<i>Atorvastatin</i>	ChTL		81,6 % \pm 8,6	107,6 % \pm 10,6
	CaspL	100 %	89,6 % \pm 27,0	111,7 % \pm 8,0
	TL		102,0 % \pm 12,6	105,1 % \pm 4,2
<i>Pravastatin</i>	ChTL		87,7 % \pm 17,9	97,9 % \pm 3,0
	CaspL	100 %	99,1 % \pm 9,4	94,9 % \pm 1,7
	TL		97,2 % \pm 14,3	94,0 % \pm 4,0

4.2.1.4 EA.hy926-Zellen: Ergebnisse einer Statinbehandlung nach 24 Stunden

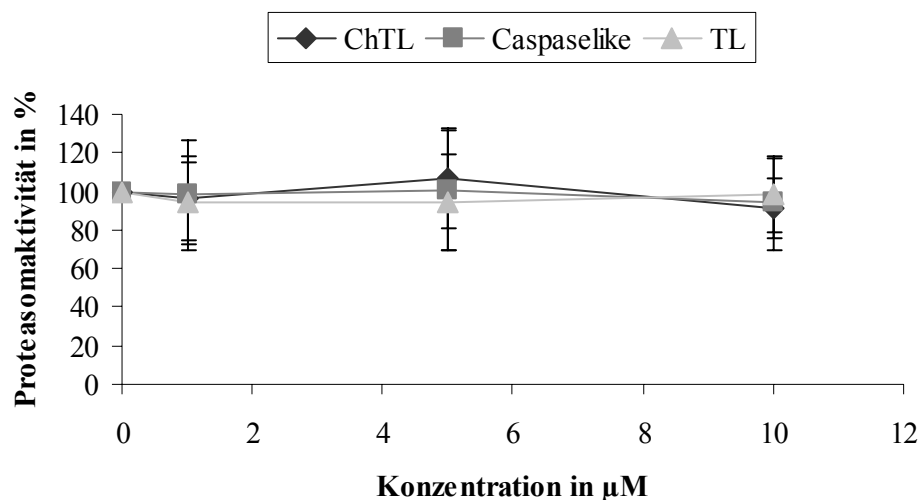


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurve einer 24-Stunden-Inkubation der EA.hy926-Zellen mit Simvastatin (Prodrug). Am Beispiel von Simvastatin sollten die Effekte der Statinwirkung auf die humane Endothelzelllinie dargestellt werden. Die Statine verursachten keine signifikante Aktivitätsänderung des Proteasoms. Alle 3 proteolytischen Zentren hatten eine Aktivität, die mit der Aktivität der Kontrollzellen vergleichbar war.

Simvastatin (Prodrug) hatte keinen Einfluss auf den Funktionszustand des Proteasoms der EA.hy926-Zellen. Die Aktivität der einzelnen Proteolyseeinheiten blieb auf dem Level der Lösungsmittelkontrolle. Die Untersuchungen mit Atorvastatin zeigten ein vergleichbares Bild. Die Konzentration von 5 µM Atorvastatin verringerte die ChTL-Aktivität auf 84,4 % ± 17,5. Die Dosis von 10 µM Atorvastatin setzte diese Aktivitätsänderung nicht fort, sondern kehrte sie wieder um. Es war eine ChTL-Aktivität von 104,5 % ± 11,3 zu messen ($P=0,331$). Die beiden anderen Proteolysezentren wurden in ihrer Aktivität nicht verändert. Die Aktivität blieb auf dem Niveau der Kontrolle. Atorvastatin konnte die proteasomale Funktion nicht hemmen. Pravastatin hatte ebenso keinen Effekt auf Aktivität des Proteasoms. Durch 1 µM Pravastatin sank die gemessene ChTL-Aktivität auf 84,6 % ± 12,9 bezüglich der Kontrolle. Mit der Dosissteigerung auf 10 µM hatte das Proteasom eine Aktivität von 79,7 % ± 3,0. In der statischen Auswertung konnte Pravastatin nicht als Inhibitor der ChTL erkannt werden ($P=0,275$). Die CaspL-Aktivität ($P=0,984$) und die TL-Aktivität ($P=0,616$) wurden ebenfalls nicht verändert.

Im Vergleich dazu konnten 10 μM des bekannten Proteasominhibitors Lactacystin die ChTL nach 24 Stunden um 30 % verringern ($P=0,083$). Die Untersuchung der caspase-ähnlichen Aktivität zeigte einen Funktionsanstieg auf 128,8 % ($P=0,192$). Die Aktivität des trypsin-ähnlichen Zentrums lag bei 92,7 % ($P=0,502$). Nach dieser Zeit konnte keine signifikante Hemmung des Proteasoms mit dem bekannten Proteasominhibitors gemessen werden. Möglicherweise lag der Fehler in der Behandlung der EA.hy926-Zellen.

Die gleichzeitige Zugabe von 400 μM Mevalonsäure zu den Statinen hatte keinen Einfluss auf die Proteasomaktivität. Somit zeigte sich auch nach einer 24-stündigen Inkubation kein direkt modulatorischer Effekt der Mevalonsäure auf das Zellproteasom.

4.2.1.5 VSMC: Ergebnisse einer Statinbehandlung nach 24 Stunden

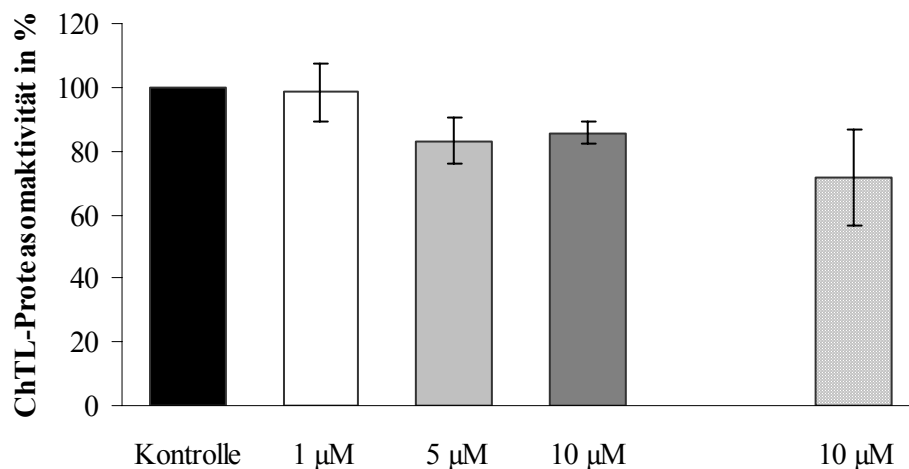


Abb. 18: Darstellung der ChTL-Aktivität der VSMC-Zellen nach der 24-stündigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Atorvastatin im Vergleich zu 10 μM β -clasto Lactacystin. Durch Atorvastatin konnte diese proteasomale Aktivität leicht gehemmt werden. Die Konzentration von 1 μM Atorvastatin war noch nicht effektiv. Erst ab einer Konzentration von 5 μM wurde eine leichte Hemmung der ChTL deutlich.

In den glatten Muskelzellen verursachte die Gabe von Atorvastatin eine leichte Hemmung der

ChTL-Aktivität (Abb. 18). Mit der Dosis von 5 μ M Atorvastatin konnte eine Abnahme der proteasomalen ChTL-Aktivität auf $83,2 \% \pm 7,3$ erzeugt werden. 10 μ M Atorvastatin verringerten die Aktivität nicht weiter, so dass die ChTL-Aktivität insgesamt um $14,4 \% \pm 3,3$ inhibiert war ($P=0,019$). Im Vergleich zu β -clasto Lactacystin fiel die Hemmung der proteasomalen Untereinheit nach Atorvastatingabe deutlich geringer aus. Nach 10 μ M Lactacystin betrug die ChTL-Aktivität nur noch $71,5 \% \pm 15,1$. Atorvastatin hatte keinen Effekt auf die CaspL-Aktivität und die TL-Aktivität. Die Aktivität blieb auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle.

Die Gabe von Simvastatin (Prodrug) hatte keinen Einfluss auf den Funktionszustand des Proteasoms. Die Aktivität lag bei allen 3 proteolytischen Einheiten auf dem Level der Lösungsmittelkontrolle um $100 \% \pm 13$.

1 μ M und 5 μ M Pravastatin führten zu einem leichten Absinken der ChTL und der TL. Die CaspL-Aktivität blieb völlig unverändert. 10 μ M Pravastatin senkte die Aktivität aller 3 Proteolyseeinheiten auf etwa 70 %. Anhand der statistische Analyse konnte dieses Absinken jedoch nicht als signifikant gesehen werden (ChTL ($P=0,476$), CaspL ($P=0,343$) und TL ($P=0,162$)). Die Behandlung mit Pravastatin war ebenfalls ohne Wirkung auf die Proteasomaktivität.

Mevalonat modulierte auch in den VSMCs die Proteasomaktivität nicht. Die Aktivität des Proteasoms lag auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle.

4.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Statinbehandlung

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Statinbehandlung konnten nur punktuell Veränderungen der proteasomalen Aktivität gefunden werden. Lediglich die Gabe von Atorvastatin führte zu einer geringen Senkung der TL-Aktivität in den CPAE-Zellen nach 6-Stunden-Inkubation und der ChTL-Aktivität in den glatten Muskelzellen nach einer 24-Stunden-Behandlung. Die durch Atorvastatin erzeugte Hemmung fiel im Vergleich zu dem bekannten Proteasomhemmer Lactacystin deutlich geringer aus. Nach der Atorvastatinbehandlung hatten die Zellen noch eine Restaktivität von etwa 80 %. Weitere Effekte konnten durch Atorvastatin nicht erzeugt werden.

Die Behandlung mit Simvastatin (Prodrug) und Pravastatin hatte keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand des Proteasoms. Die in diesen Versuchen gemessenen Veränderungen waren nicht signifikant.

Die Behandlung vaskulärer Zelllinien mit den in der cholesterolsenkenden Therapie effektiv eingesetzten Statinen brachte nur vereinzelt eine Verringerung der proteasomalen Aktivität hervor. Somit konnten die phänotypischen Erscheinungen einer Statinbehandlung nicht auf eine Hemmung der proteasomalen Aktivität zurückgeführt werden. Des Weiteren verdeutlichten diese Ergebnisse, dass Statine in diesen moderaten Konzentrationen nicht als echte Hemmer des Proteasoms betrachtet werden konnten.

Die simultane Gabe von Mevalonsäure modulierte nicht die Proteasomaktivität. Somit ließen sich die mikroskopisch beobachteten Strukturveränderungen nicht auf proteasommodulatorische Effekte zurückführen.

4.2.3 Die Wirkung von Mevalonsäure auf das Proteasom der Zelle

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden mit sehr hohen Konzentrationen dieses Zwischenproduktes des Cholesterolfstoffwechsels behandelt. Es wurden Dosen zwischen 400 µM und 5 mM über eine Dauer von jeweils 24 und 48 Stunden verabreicht. Ziel dieser Versuche war, die These aufzugreifen, dass Mevalonat ein Aktivator der proteasomalen Aktivität sei [Rao 1999]. Die Resultate zeigten, dass Mevalonat in diesem Versuchsaufbau nicht als Aktivator der Proteasomaktivität zu werten war. Die proteasomale Aktivität blieb auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Auch in den sehr hohen Konzentrationen blieb die Aktivität des Proteasoms bei 100 % ± 10. Daher ließen sich keine konzentrationsabhängigen Veränderungen nachweisen. Dieselben Ergebnisse ergaben sich auch bei einer 24-stündigen Behandlung mit dieser Substanz. Die Untersuchung der anderen Zelllinien brachte identische Ergebnisse hervor. Es konnte kein aktivitätssteigernder Einfluss beobachtet werden.

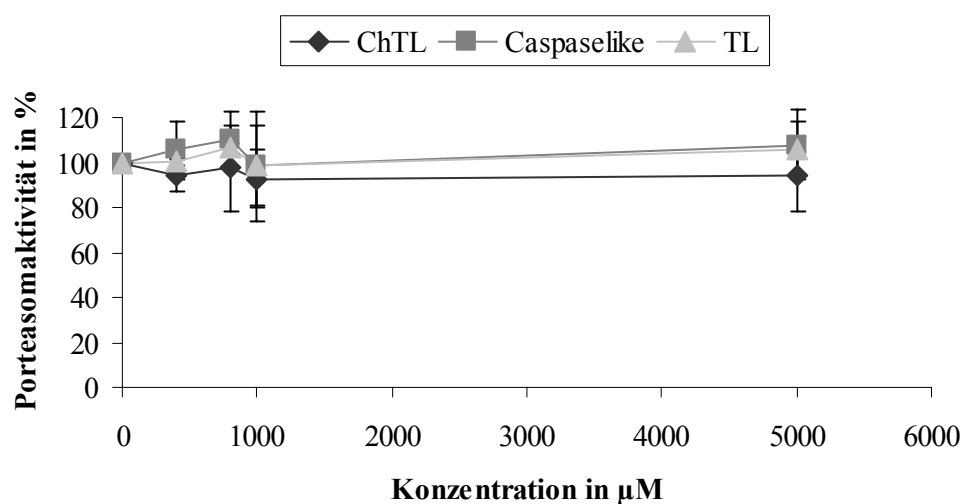


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurve nach der 48-Stunden-Behandlung der CPAE-Zellen mit Mevalonsäure. Die Aktivität aller 3 proteolytischen Untereinheiten lag auf dem Niveau der Kontrollzellen (ChTL ($P=0,960$), CaspL ($P=0,853$) und TL ($P=0,484$)). Mevalonsäure blieb ohne Wirkung auf den proteasomalen Funktionszustand. Aus diesen Ergebnissen heraus konnte Mevalonat nicht als Aktivator des Proteasoms identifiziert werden.

Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen lässt sich sagen, dass Mevalonat keinen modulatorischen Effekt auf das Proteasom hatte. Dieses Ergebnis deckte sich auch mit den Beobachtungen des Phänotyps.

4.3 Das isolierte 20S Proteasom - Wirkung von der Statine und Mevalonsäure

Mit den Untersuchungen an isolierten 20S Proteasomen sollten direkte Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und der Mevalonsäure auf die proteolytische Aktivität dieses Partikels dargelegt werden. Da in diesem Versuchsaufbau keinerlei zelluläre Elemente eine Rolle spielten, war es möglich, die sehr hohe Konzentration von 100 μM Statin zu verwenden. Es sollte gewährleistet werden, dass eine ausreichend hohe Konzentration der zu untersuchenden Substanzen im Reaktionsansatz war, um auch einen geringen Einfluss zu erkennen. Weiterhin fielen die verschiedenen zellulären Signalwege weg, so dass die Voraussetzung geschaffen war, direkte Effekte auf das Proteasom nachweisen zu können. Für die Messungen mit Mevalonsäure wurden dieselben Konzentrationen verwendet wie bei der zellulären Behandlung. Die isolierten 20S Partikel wurden in Anlehnung an die Arbeit von Wojcik über einen Zeitraum von 2,5 Stunden mit den Substanzen inkubiert [Wojcik 2000]. Der bekannte Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin wurde als Positivkontrolle verwendet.

4.3.1 Effekte von 100 μM HMG-CoA-Reduktase-Hemmer auf 20S Proteasomen

Aus der Abbildung 20A geht hervor, dass die ChTL-Aktivität des Proteasoms durch die Statine sehr leicht erhöht und nicht gehemmt wurde. Die Behandlung mit Simvastatin (Prodrug) zeigte einen sehr geringen Effekt. Die Aktivität konnte, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, auf $107,1 \% \pm 0,6$ gesteigert werden ($P=0,04$). Nach der Behandlung mit 100 μM Atorvastatin lag die Aktivität bei $117,1 \% \pm 2,9$ ($P=0,014$). Pravastatin erhöhte die Aktivität des isolierten 20S Proteasoms auf $116,9 \% \pm 3,5$ ($P=0,021$). Im Vergleich dazu war die ChTL-Aktivität des Proteasoms nach einer Behandlung mit β -clasto Lactacystin fast vollständig gehemmt.

Auf die caspase-ähnliche Aktivität hatten die Statine keinen Einfluss. Die Aktivität lag nach 100 μM Simvastatin (Prodrug), 100 μM Atorvastatin und 100 μM Pravastatin vergleichbar auf dem Level der Lösungsmittelkontrolle. Durch Lactacystin wurde die CaspL-Aktivität erwartungsgemäß signifikant gehemmt. Auch hier wurde deutlich, dass die Statine das proteasomale Proteolysesystem nicht im Sinne von β -clasto Lactacystin inhibierten (Abb. 20B).

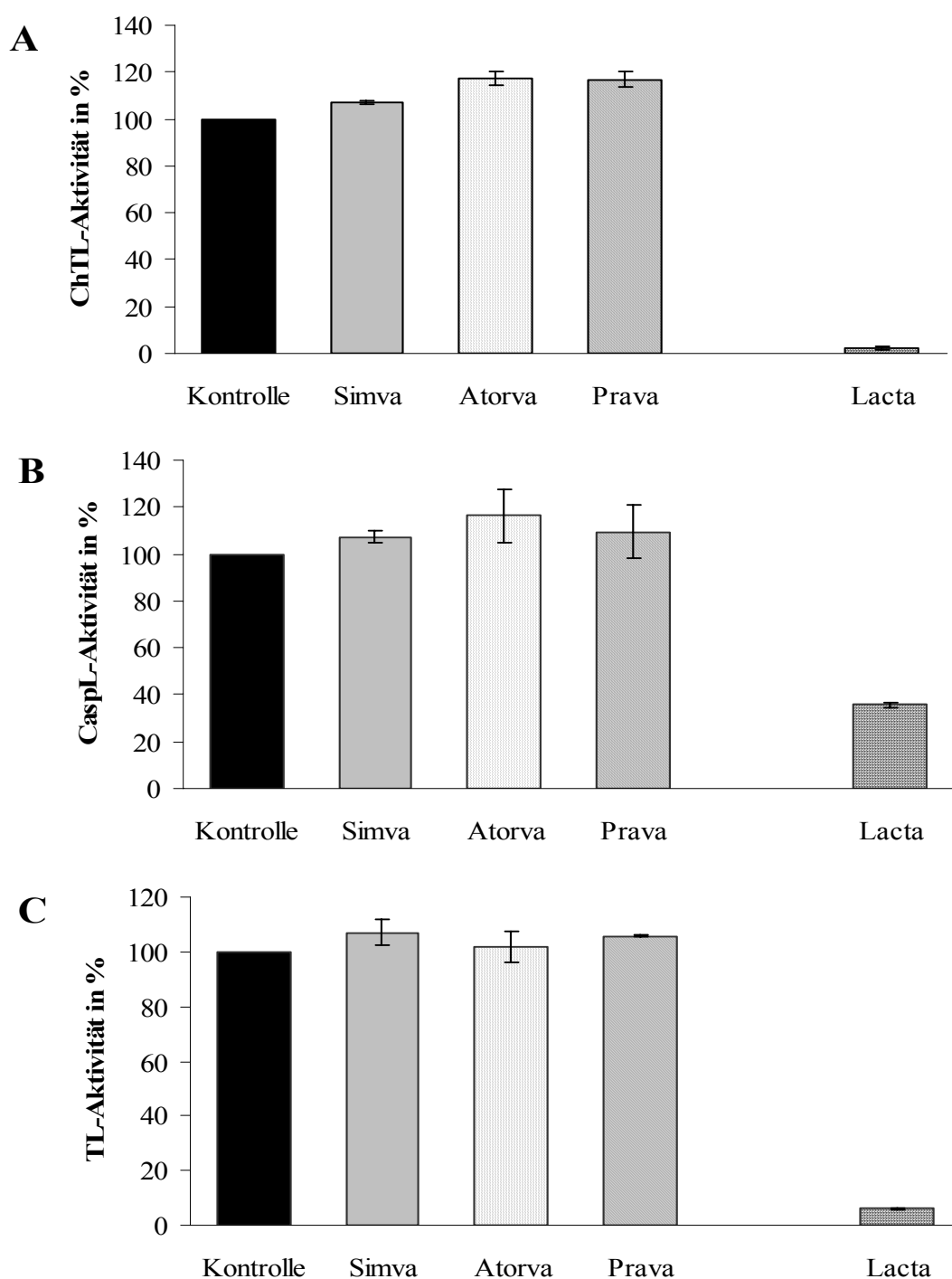


Abb. 20: Proteasomaktivität des hoch gereinigten 20S Proteasoms nach einer 2,5-Stunden-Behandlung mit 100 μ M der verschiedenen CSE-Hemmer und 10 μ M β -clasto Lactacystin. Durch die Behandlung mit den verschiedenen Statinen konnte die ChTL-Aktivität leicht bis 15 % erhöht werden. Auf die anderen proteolytischen Einheiten des Proteasoms hatten die Statine keinen Einfluss. Im Vergleich dazu war die Proteasomaktivität nach Lactacystinbehandlung fast vollständig gehemmt.

Die Resultate der TL-Aktivitätsmessung zeigten ein vergleichbares Bild zu den bereits dargelegten Ergebnissen der CaspL-Aktivität. 100 μM Statin hatten keinen Einfluss auf die TL-Aktivität des isolierten Proteasoms. Die Aktivität lag nach Behandlung mit den 3 CSE-Hemmern unverändert auf dem Niveau der Kontrolle. Auch hier zeigte sich wie erwartet β -clasto Lactacystin als starker Inhibitor der trypsin-ähnlichen Aktivität. So konnte diese proteolytische Einheit durch das Einwirken der Statine im Vergleich zu dem irreversiblen Proteasominhibitor nicht gehemmt werden (Abb. 20C).

Bei den Versuchen am isolierten 20S Proteasom führte die Behandlung mit den Statinen nicht zu einer Hemmung der Proteasomfunktion. Die ChTL-Aktivität wurde durch die Statine leicht erhöht. Da diese Aktivierung mit einer sehr hohen Dosis erreicht wurde, kann davon ausgegangen werden, dass moderate Konzentrationen keinen Einfluss auf die proteasomale Aktivität haben würden. Dabei spielte die unterschiedliche Laktonringform der Statine keine Rolle. Anhand dieser Resultate konnte gezeigt werden, dass die proteasomale Aktivität durch die Statine nicht direkt moduliert wird.

4.3.2 Effekte der Inkubation mit Mevalonsäure

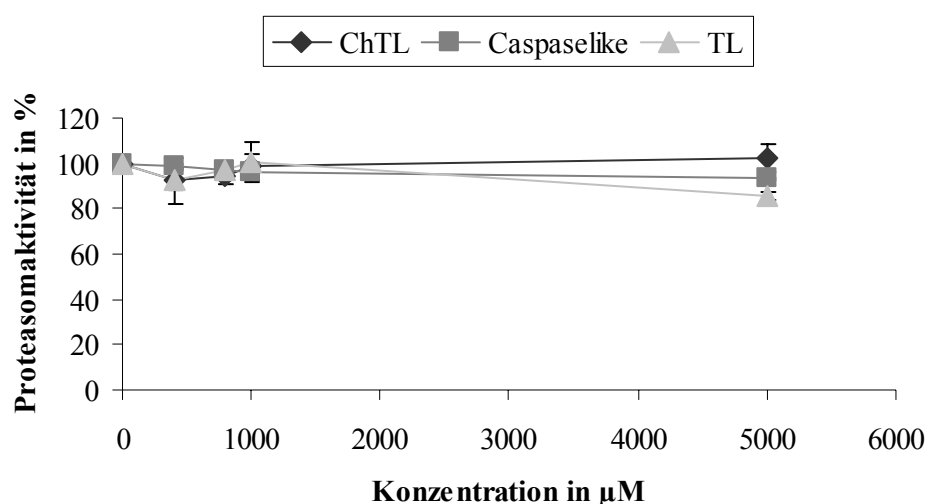


Abb. 21: Dosis-Wirkungskurve einer 2,5-stündigen Inkubation der isolierten 20S Proteasomen mit verschiedenen Konzentrationen Mevalonat. Alle drei proteolytischen Einheiten blieben durch die Behandlung unverändert. Die Aktivität lag auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Es erfolgte keine Modulation der Proteasomaktivität durch die Behandlung mit Mevalonsäure.

Aus den Ergebnissen einer 2,5-stündigen Behandlung der isolierten 20S Partikel mit Mevalonat ließ sich kein proteasommodulatorischer Effekt ablesen (Abb. 21). Nach der Behandlung mit den zu testenden Konzentrationen Mevalonat lag die Proteasomaktivität auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Die ChTL pegelte sich auf dem Niveau von $100 \% \pm 8$ ein ($P=0,104$). Die CaspL-Aktivität lag nach den verschiedenen Dosen an Mevalonat bei etwa $100 \% \pm 7$ ($P=0,061$). Die TL-Aktivität verhielt sich ähnlich wie die beiden anderen beschriebenen Proteasomaktivitäten. Auffallend war, dass bei der Dosis von 5 mM ein leichtes Absinken der TL-Aktivität auf $85,6 \% \pm 1,9$ zu erkennen war. Dieses Absinken der Aktivität konnte jedoch nicht als eine Hemmung betrachtet werden ($P=0,251$). Somit blieb die proteasomale Aktivität durch die Einwirkung von Mevalonat unberührt.

Das Zwischenprodukt des Cholesterolstoffwechsels Mevalonsäure hatte keinen modulierenden Einfluss auf den Funktionszustand des isolierten 20S Proteasoms.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit den verschiedenen CSE-Hemmern wurde in den Cholesterolstoffwechsel der untersuchten Zellen eingegriffen. Dies führte zu strukturellen Zellveränderungen, Veränderungen im Wachstumsverhalten und einer veränderten Viabilität der Zellen. Mit steigender Konzentration der Statine wurden die Zellen länglich, rundeten sich ab und lösten sich von der Unterlage ab. In Konzentrationen über 10 μM wurden die vaskulären Zellen zytotoxisch verändert und die Nettowachstumsrate sank.

Atorvastatin konnte im zellulären System ein leichtes Absinken der ChTL (CPAE-Zellen - endotheliale Zelllinie) und der TL (VSMCs) erzeugen. Ansonsten hatten die Statine in diesem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Proteasomaktivität.

In den Versuchen mit isolierten 20S Proteasomen konnten 100 μM Statin die ChTL-Aktivität leicht erhöhen. Die anderen Aktivitäten wurden nicht beeinflusst. Anhand dieser Resultate zeigte sich, dass die CSE-Hemmer keinen direkten Einfluss auf das Proteasom hatten.

Die Statine waren weder als Inhibitoren noch als Aktivatoren des Proteasoms zu erkennen. Auch bestanden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Laktonringformen. Aus den

dargelegten Ergebnissen konnte herausgestellt werden, dass die strukturellen Effekte mit der Proteasomaktivität nicht korrelierten.

Mevalonsäure hatte keinen Einfluss auf die Proteasomaktivität.

Die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und die Mevalonsäure sind keine Modulatoren der proteasomalen Aktivität.

5 Diskussion

5.1 Statine und ihre Wirkung auf das Proteasom

5.1.1 Statine waren keine Hemmer des 20S Proteasoms

Die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und der bekannte Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin haben große Ähnlichkeit im strukturellen Aufbau. Außerdem konnten viele der von der Enzymhemmung der HMG-CoA-Reduktase unabhängigen Effekte auch mit einem spezifischen Proteasomhemmer erreicht werden. Im Einzelnen wurden die pleiotropen Effekte der Statine auf das kardiovaskuläre System wie Regulation der eNOS, Verbesserung der Plaquestabilität und die Verhinderung der Zellproliferation auch bei der Proteasominhibition mit β -clasto Lactacystin beobachtet. Wegen dieser vergleichbaren biologischen Wirkung der beiden Substanzengruppen könnte neben dem Cholesterolfstoffwechsel das Proteasom ein weiteres System sein, in das Statine regulatorisch eingreifen. Aus diesem Grund sollten die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer hinsichtlich ihrer direkten Wirkung auf das 20S Proteasom untersucht werden.

Die Untersuchungen am aus Vollblut von Kaninchen gereinigten 20S Proteasomen konnten die Hypothese der direkten inhibitorischen Wirkung der Statine auf das Proteasom nicht bestätigen. Die ChTL-Aktivität wurde durch die Zugabe von 100 μ M CSE-Hemmer leicht erhöht. Besonders Atorvastatin und Pravastatin steigerten die ChTL-Aktivität um 15 %, während die Aktivitätserhöhung durch Simvastatin (Prodrug) bei 7 % lag. Die anderen beiden Aktivitäten wurden nicht beeinflusst. Somit sind die Statine keine Inhibitoren des 20S Proteasoms im Sinne von β -clasto Lactacystin. Mit 10 μ M des bekannten Proteasominhibitors konnte die Funktion der ChTL-Aktivität praktisch vollständig gehemmt werden. Die Aktivität der beiden anderen proteolytischen Untereinheiten wurde ebenfalls signifikant verringert.

In diesem Proteasommodell wurden die CSE-Hemmer in den sehr hohen Konzentrationen als sehr leichte Aktivatoren der ChTL-Aktivität identifiziert. Derartig hohe Konzentrationen an Statinen würden im Zellsystem nicht erreicht. Diese Konzentration lag weit oberhalb der Plasmakonzentration der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer und kann daher *in vivo* keine Rolle spielen. Aus diesen Ergebnissen heraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren im therapeutischen Bereich keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms haben. Hier zeigte sich eine Übereinstimmung mit bereits beschriebenen

Untersuchungen in der Literatur [Wojcik 2000]. Auch in der Arbeitsgruppe um Wojcik konnte keine direkte Hemmung der Proteasomaktivität nachgewiesen werden. Die geschlossene Ringform der Statine führte im isolierten Proteasommodell zu einer milden Aktivierung der ChTL und zu einer deutlichen Inhibition der PGPH. Die offene Ringform der Statine konnte die ChTL-Aktivität leicht hemmen. In dieser Arbeit wurde geschlussfolgert, dass Statine Modulatoren der proteasomalen Aktivität waren [Wojcik 2000].

Diesen beiden 20S Proteasommodellen stehen die Untersuchungen am Zellextrakt gegenüber. Hier wurde jeweils eine konzentrationsabhängige Inhibition mit der geschlossenen Laktonringform der Statine erzielt. Sowohl in MDA-MB-157-Zellen [Rao 1999], einer Brustkebszelllinie, sowie in differenzierten Neuroblastomzellen [Kumar 2002] inhibierte die geschlossene Ringform von Lovastatin konzentrationsabhängig die ChTL-Aktivität. In beiden Untersuchungen stellte sich deutlich heraus, dass die offene Ringform diese Hemmung nicht erzeugte. Anhand dieser Ergebnisse wurde bewiesen, dass die Statine mit der offenen Ringform ihr eigentliches Zielenzym, die HMG-CoA-Reduktase, hemmen, aber keinen Einfluss auf die proteolytischen Einheiten des Proteasoms haben [Rao 1999].

In den eigenen Studien haben weder die geschlossene Laktonringform, Simvastatin, noch die offenen Ringformen, Atorvastatin und Pravastatin, einen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms.

Die eigenen Erkenntnisse beruhen ausschließlich auf der Messung der proteasomalen Aktivität mit den fluorogenen Substraten. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse können die Statine nicht als Modulatoren der proteasomalen Aktivität betrachtet werden. Somit bieten die Statine nicht die strukturellen Voraussetzungen, um wie Lactacystin das aktive Zentrum der proteolytischen Einheiten kovalent zu modifizieren, so dass eine Hemmung der Aktivität entstehen kann. Daraus ergibt sich, dass die pleiotropen Effekte, von denen vermutet wurde, dass sie sich durch eine direkte Hemmung der Proteasomaktivität erklären lassen, nicht über diesen Mechanismus entstehen.

5.1.2 *Mevalonsäure hatte keinen Einfluss auf die Proteasomaktivität*

Die proteasomale Aktivität wurde durch die Gabe von Mevalonat nicht verändert. Somit entfaltet Mevalonsäure ihre Wirkung nicht aufgrund einer direkten Einwirkung auf das 20S Proteasom. Deswegen kann sie nicht als Aktivator des Proteasoms, wie in der Arbeit von Rao *et al.* [Rao 1999] vorgeschlagen wurde, diskutiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass Mevalonat nicht die strukturellen Voraussetzungen hatte, um die Aktivität des Proteasoms zu modulieren. Ähnliche Aussagen wurden auch in den Arbeitsgruppen um Wojcik [Wojcik 2000] und Kumar [Kumar 2002] getroffen.

Es bestanden keine direkten Interaktionen zwischen den CSE-Hemmern, der Mevalonsäure und dem isolierten 20S Proteasom. Im zellulären System zeigten sich nach der Behandlung jedoch vergleichbare Struktureffekte zwischen den einzelnen Wirksubstanzen. Somit könnten zellulär vermittelte Signalwege eine Rolle spielen.

5.1.3 *Wirkmechanismus der Statine und des Proteasominhibitors Lactacystin*

5.1.3.1 *Statine und β -clasto Lactacystin induzierten massive Zellveränderungen*

Durch die Behandlung vaskulärer Zelllinien mit Statinen und dem bekannten Proteasominhibitor β -clasto Lactacystin konnten verschiedene phänotypische Veränderungen beobachtet werden. Bereits geringe Konzentrationen der jeweiligen Substanzen führten zu starken zellulären Veränderungen. Mikroskopisch betrachtet zeichneten sich vergleichbare strukturelle Zellveränderungen ab. Diese parallele Wirkung zwischen den Statinen und den Proteasominhibitoren wurde auch in einer Brustkrebszelllinie [Rao 1999] beobachtet.

Zwischen den beiden Strukturformen der Statine, der geschlossenen Laktonringform und der offenen Form, gab es keine ausgeprägten Differenzen. Je höher die CSE-Hemmer konzentriert wurden, desto deutlicher waren degenerative Veränderungen ausgeprägt. Auch in C-26-Zellen [Wojcik 2000] und in murinen Neuroblastomzellen [Kumar 2002] waren diese Effekte nachgewiesen worden.

5.1.3.1.1 Pravastatin zeigte weniger deutlich ausgeprägte Struktureffekte

Nach einer Behandlung mit Pravastatin waren die Zellen weniger beeinträchtigt. Die degenerativen Veränderungen waren nicht so stark ausgeprägt. Sie waren jedoch sichtbar und nicht völlig abwesend, wie anhand von Versuchen an NB-Zellen von Kumar *et al.* beschrieben wurde [Kumar 2002]. Da diese Unterschiede ausschließlich bei Pravastatin gesehen wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass sie unabhängig von der β -Laktonringform waren. Die Ursache für diese beobachtete Differenz war in der Struktur von Pravastatin zu suchen. Pravastatin ist im Vergleich zu den beiden anderen Statinen sehr hydrophil [Serrajuddin 1991]. Aufgrund seiner hohen Hydrophilie bleibt Pravastatin verglichen mit den beiden anderen Substanzen deutlich geringer zellgängig. Um den Fehler der verminderten Zellgängigkeit [van Vliet 1995] zu reduzieren, wurde Pravastatin in DMSO gelöst. Damit konnte die Wirksamkeit jedoch nicht verbessert werden.

5.1.3.1.2 Die Wirkung der Statine auf die verschiedenen Zelllinien stand in Abhängigkeit der Zelleigenschaften

Die eigenen Untersuchungen verdeutlichten, dass die endothelialen Zelllinien durch die Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern deutlich stärker in ihrem Phänotyp verändert waren, als dies bei den glatten Muskelzellen der Fall war. Besonders die CPAE-Zellen waren durch die Inkubation mit Statinen stärker degenerativ verändert.

Die Wirkung der Statine in extrahepatischen Geweben hing davon ab, wie und ob die CSE-Hemmer in das Innere der Zelle gelangen [van Vliet 1995]. Ein unterschiedlicher Rezeptoren- und Transporterbesatz der verschiedenen Zelllinien stellte den limitierenden Faktor dar. Andererseits wäre es denkbar, dass sich die phänotypischen Differenzen durch ein unterschiedliches intrazelluläres Enzym- und Effektormuster erklären ließen. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Menge an intrazytoplasmatischer HMG-CoA-Reduktase ebenfalls einen Einfluss hatte.

Statine werden in der Therapie von Hypercholesterolämie sehr wirkungsvoll eingesetzt. Bei der Genese atherosklerotischer Prozesse spielen vor allem endotheliale Vorgänge eine Rolle. Auch die pleiotropen Effekte der Statine beziehen sich vorwiegend auf das Endothel. Dies würde die sichtbaren Veränderungen der verschiedenen Zelllinien unter anderen erklären. Weiterhin könnte

die unterschiedliche Stoffwechselrate bei den zellulären Vorgängen von Bedeutung gewesen sein.

5.1.3.2 Mevalonsäure hob die lactacystin-induzierten Strukturveränderungen nicht auf

In allen vaskulären Zelllinien konnte die simultane Gabe von Mevalonat die statin-induzierten Effekte vollständig aufheben. Die Zellen hatten ein vergleichbares Aussehen wie die unbehandelten Kontrollzellen. In den Arbeitsgruppen um Wojcik [Wojcik 2000] und Kumar [Kumar 2002] führte die simultane Inkubation der Zellen mit den Statinen und Mevalonat zu demselben Ergebnis. Durch die Gabe von Mevalonat konnten Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Hemmung nachgewiesen werden.

In der Literatur stellte sich die Frage, ob Mevalonat als Aktivator der Proteasomaktivität zu sehen war [Rao 1999]. Die Ergebnisse zeigten, dass Mevalonsäure keinen Einfluss auf die strukturellen Veränderungen, die durch β -clasto Lactacystin verursacht wurden, hatte. Der Phänotyp war derselbe wie nach alleiniger Behandlung mit Lactacystin. Somit wurde nachgewiesen, dass auch auf struktureller Ebene die Statine nicht über eine Inhibition des Proteasoms wirkten. Die durch die CSE-Hemmer hervorgerufenen zellulären Veränderungen waren nicht auf eine Proteasomhemmung zurückzuführen, da durch Mevalonat die lactacystin-induzierten Veränderungen nicht aufgehoben wurden. Außerdem zeigte sich in Versuchen am isolierten 20S Proteasom, dass Mevalonsäure das Proteasom nicht beeinflusste. Dadurch wurde verständlich, dass die Aufhebung der strukturellen Veränderungen mittels gleichzeitiger Gabe von Mevalonat nicht durch eine Aktivitätsänderung des Proteasoms bedingt war. Die zellulären Veränderungen der Statine entstanden durch den Eingriff in den Stoffwechselweg des Cholesterols. So liefen die ähnlichen Strukturveränderungen im Zellsystem über andere Wege ab, dass heißt, es bestand ein Unterschied zwischen den statin-induzierten und den lactacystin-induzierten Effekten.

5.1.3.3 Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase könnten Veränderungen am Aktinzytoskelett auftreten

Das Zielsubstrat des Laktorrings der Statine ist die HMG-CoA-Reduktase. Dieser Ring bietet ein HMG-CoA-ähnliches Motiv, wodurch die Statine kompetitiv an der aktiven Seite des Enzyms binden können [Istvan 2001, Istvan 2003]. Damit wird Einfluss auf die Biosynthese von Isoprenoiden und Cholesterol genommen. Durch die Bindung an die HMG-CoA-Reduktase unterbleibt auch die Bildung der Isoprenylderivate [Goldstein 1990]. Durch die Gabe dieser Stoffwechselmetabolite wurden die Effekte komplett verhindert. Somit spielen die Isoprenoide bei der Regulation zellulärer Veränderungen eine spezifische Rolle.

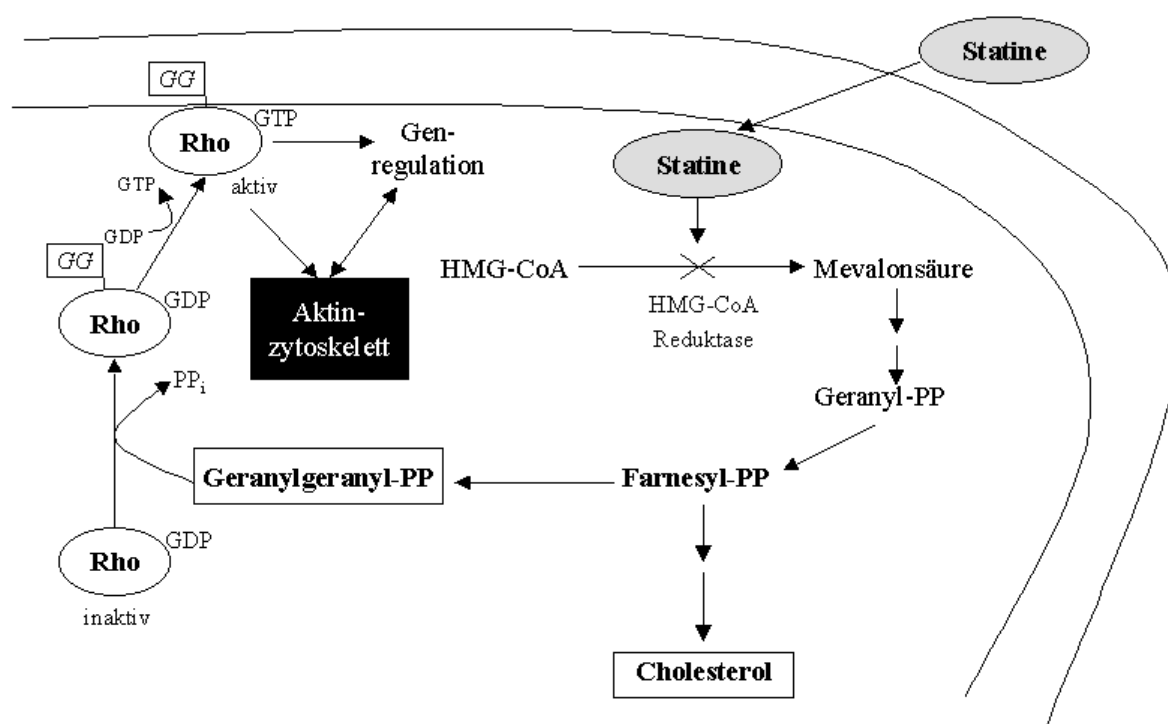


Abb. 22: Modell über die Entstehung der Zellveränderungen durch die Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (verändert nach der Vorgabe von [Laufs und Liao 2000]).

Durch das Aktinzytoskelett werden eine Reihe wichtiger biologischer Funktionen vermittelt. Über diesen Weg werden strukturelle Voraussetzungen wie Zellform, die zelluläre Polarität sowie dynamische Prozesse wie Zellteilung und Wanderung reguliert [Hall 1998]. Vertreter der

Rho-GTPasen-Gruppe stellen sich als die Schlüsselregulatoren des Aktinzytoskeletts dar. Durch die Gabe von Statinen wird in die Bildung der kleinen GTP-bindenden Proteine eingegriffen. Auf diese Weise könnten sich die charakteristischen strukturellen Veränderungen im Mikrofilament- und Mikrotubulisystem ausbilden, die durch die Statine induziert werden [Meske 2003].

Die Veränderungen im Zytoskelett der Zelle durch die Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer hätten so einen direkten antiatherosklerotischen Effekt [Bellosta 1998].

5.1.3.4 Lactacystin führte über einen bisher unbekannten Mechanismus zu den Zellveränderungen

Mittels des geschlossenen Laktonrings konnte β -clasto Lactacystin [Dick 1996] spezifisch an die N-terminalen Threoninreste der aktiven Zentren des Proteasoms binden. Durch die Modifikation der Threoninreste können die katalytischen Untereinheiten ubiquitinierte Proteine nicht mehr abbauen. Somit wurde die proteolytische Funktion des Proteasoms unterbrochen [Fenteany 1995].

Möglicherweise basierten die strukturellen Veränderungen durch β -clasto Lactacystin ebenfalls auf den Eingriff in das Aktinzytoskelett. Diese Strukturänderungen könnten möglicherweise mit den Folgen der Proteasomhemmung im Zusammenhang stehen.

Die Statine konnten weder in Untersuchungen am isolierten 20S Proteasom noch durch die mikroskopisch beobachteten Phänotypveränderungen als Proteasominhibitoren identifiziert werden. Konnte die Messung der zellulären Proteasomaktivität diese Aussage bekräftigen?

5.1.4 Im Zellmodell hatten die Statine nur einen geringen Einfluss auf das Proteasom

5.1.4.1 Atorvastatin, die offene Ringform, hemmte leicht die TL in den CPAE-Zellen und die ChTL in den VSMC-Zellen

Im Zellsystem konnte Atorvastatin als leichter Inhibitor der proteasomalen Aktivität identifiziert werden. Nach einer 6-Stunden-Behandlung war die TL der CPAE-Zellen um 20 % gehemmt. Nach der 24-stündigen Inkubation mit Atorvastatin war die ChTL-Aktivität der glatten Muskelzellen um 15 % inhibiert. Die Inhibition mit Atorvastatin fiel verglichen mit der durch den bekannten Proteasomhemmer Lactacystin induzierten deutlich geringer aus. Weiterhin war zu bemerken, dass diese inhibitorischen Effekte ausschließlich bei der TL in CPAE-Zellen und der ChTL-Aktivität in VSMC-Zellen auftraten. Daher spielte vermutlich die geringe Hemmung der beiden proteolytischen Untereinheiten durch die offene Ringform Atorvastatin keine physiologische Rolle. In allen anderen untersuchten Zelllinien wurde die proteasomale Aktivität durch Atorvastatin nicht beeinflusst. Auch die unterschiedliche Dauer der Inkubation brachte keine Unterschiede hervor. Aus diesem Grund musste zu dem Ergebnis kritisch bemerkt werden, dass Atorvastatin nicht allgemeingültig als Proteasominhibitor bezeichnet werden konnte. Aufgrund dessen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Atorvastatin kein direkter Proteasominhibitor im Sinne von β -clasto Lactacystin war. Eine vitale Beeinträchtigung der Zellen könnte möglicherweise die Ursache dieser Ergebnisse gewesen sein. Weiterhin ist bekannt, dass die Statine in den Zellzyklus [Laufs, Marra 1999] eingreifen. Dadurch konnten sich intrazellulär verschiedene Signalwege verändern, die möglicherweise zu diesen Resultaten führten.

5.1.4.2 Keine Proteasominhibition durch die Statine

Die untersuchten Statine, Simvastatin (Prodrug), Atorvastatin und Pravastatin, hatten keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand des Proteasoms. Da alle Statine denselben Effekt hatten, konnte dementsprechend kein Unterschied zwischen der geschlossenen und der offenen β -Laktonringform gefunden werden. Anhand dieser Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die zellulären Strukturveränderungen nicht durch eine Proteasomhemmung erklärbar waren. Da das Proteasom nicht inhibiert war, konnten auch nicht davon ausgegangen werden, dass es zellulär vermittelte Signalwege gab, die eine Proteasomhemmung induzieren konnten.

In anderen nicht vaskulären Zellsystemen zeigten sich gegensätzliche Ergebnisse. Durch eine 36-Stunden-Behandlung von MDA-MB-157-Zellen konnte eine starke Hemmung der Proteasomaktivität erreicht werden [Rao 1999]. Diese Hemmung wurde mit sehr hohen Konzentrationen erreicht. Die in den eigenen Versuchen verwendeten Zelllinien bereits bei einer Konzentration über 10 μ M Statin massiv in ihrer Funktion eingeschränkt waren. Daher war der Einsatz sehr hoher Konzentrationen für die eigenen Versuchen nicht sinnvoll. Mit 10 μ M Statin wurden in den Einzelversuchen starke Schwankungen der proteasomalen Aktivität beobachtet. Somit wäre denkbar, dass eine verminderte Viabilität, der Zelltod und die daraus entstehenden Signale für die geringere Aktivität des Proteasoms verantwortlich waren.

Mit den Resultaten von Rao und Mitarbeitern [Rao 1999] übereinstimmend war die Tatsache, dass durch die offene Ringform der Statine keine Inhibition des Proteasoms erreicht wurde. Atorvastatin und Pravastatin hatten keinen Einfluss auf die proteasomale Aktivität in vaskulären Zelllinien. Anhand der untersuchten Zelllinien wurde gezeigt, dass das Proteasom weder durch die Vorstufenform noch durch die metabolische aktive Form der CSE-Hemmer verändert wurde. Diese Resultate fanden Zustimmung mit den Untersuchungen an differenzierten Neuroblastomzellen [Kumar 2002]. Hier wurde die proteasomale Aktivität durch die Vorstufenform von Lovastatin nicht gehemmt. Auch in anderen Versuchen konnte die offene Ringform keine Hemmung der proteasomalen Aktivität erzeugen [Wojcik 2000, Kumar 2002, Murray 2002]. Eine Aktivitätszunahme der ChTL wie sie die Ergebnisse von Wojcik *et al.* [Wojcik 2000] zeigten, konnte aber nicht beobachtet werden.

Die Resultate begründeten sich auf der Tatsache, dass die Statine sehr spezifische Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase sind [Istvan 2001]. Es genügten bereits geringe Dosen, um die HMG-CoA-Reduktase wirkungsvoll zu inhibieren. Wie anhand der isolierten 20S Partikel bewiesen wurde, bestand keine direkte Affinität zu den Strukturen des zellulären Proteasoms, die dazu geführt hätte, die Proteasomaktivität zu verändern. Im Zellkulturmodell standen die durch die starke Bindung an die HMG-CoA-Reduktase erzeugten Signalwege im Vordergrund.

Insgesamt hatten die Statine keinen einheitlichen Effekt auf die bisher untersuchten Zelllinien, was sich in der Literatur deutlich widerspiegelte. Es wurden vereinzelt Effekte beobachtet, die sich in allen untersuchten Zellmodellen unterschieden. Im zellulären System wurden sowohl inhibitorische als auch aktivitätssteigernde Effekte gesehen. Auf die Proteasomaktivität der vaskulären Zelllinien hatten die Statine keinen Einfluss. Somit kann nicht davon ausgegangen

werden, dass Statine als direkte Proteasominhibitoren wie β -clasto Lactacystin auszusehen sind. Die Differenzen der Wirkungen könnten möglicherweise durch die unterschiedliche Aufnahmerate und durch einen unterschiedlichen Metabolismus der Substanzen innerhalb der Zellen hervorgerufen werden [Rao 1999]. Eine andere Erklärung wäre, dass das Medium die geschlossene Ringform der Statine in die offene Form umwandelte [Kumar 2002]. Weiterhin konnte nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Ziele in den Zellen existierten, die möglicherweise auch Regulatorkomplexe des 26S Proteasoms einbeziehen [Wojcik 2000].

5.1.4.3 Mevalonsäure konnte nicht als Modulator der Proteasomaktivität erkannt werden

Die simultane Gabe von Mevalonat hatte keine Auswirkungen auf die Proteasomaktivität. Ebenfalls in anderen Aktivitätsmessungen im Zellextrakt [Kumar 2002] wurde gezeigt, dass Mevalonsäure keinen Einfluss auf die proteasomale Aktivität in Kombination mit einer Statinbehandlung hatte. So sind diese Messergebnisse konträr zu den Resultaten, die Rao *et al.* im Zellextrakt durch die Gabe Mevalonsäure erzielt hatte [Rao 1999].

Andere Effekte der Mevalonsäure konnten in Kombination mit den Statinen nicht beobachtet werden. Anhand der Experimente wurde herausgefunden, dass die Statine nicht mit dem Proteasom wechselwirkten, so dass eine Inhibition entsteht konnte. Weiterhin zeigte eine simultane Zugabe von Mevalonat keinen Effekt auf die Proteasomaktivität. Somit stellt sich aus diesen Untersuchungen heraus, dass Mevalonsäure nicht als Modulator des zellulären Proteasoms betrachtet werden kann.

Die Behandlung mit Mevalonsäure hatte keinen Effekt auf die proteasomale Aktivität.

5.2 Statine und ihr Einfluss auf die Zellen

5.2.1 Statine hatten antiproliferative Eigenschaften

Es ist bekannt, dass Statine durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase einen antiproliferativen Einfluss auf das Zellwachstum haben. Dies hat seine Ursache in der Tatsache, dass die CSE-Hemmer durch ihren Eingriff in den Syntheseweg des Cholesterols die Bildung der Isoprenoidderivate [Goldstein 1990] verhindern. Dadurch konnten die kleinen GTP-bindenden Proteine nicht isoprenyliert werden, was dazu führte, dass diese inaktiv blieben. Rho spielt bei der Aufrechterhaltung und der Wiederherstellung der Zellmembran eine entscheidende Rolle. Dessen Inaktivierung durch die Statine führte dazu, dass die Zellen apoptotisch wurden [Guijarro 1998]. Dies geschah durch die Herunterregulation der Expression von Bcl-2, einem Inhibitor der Apoptose [Blanco-Colio 2002]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Aktivität der Caspase 9 [Blanco-Colio 2002] induzierten. Dadurch wurde die Zellmembran der Zelllinien zerstört, was sich wiederum in der Nettowachstumsrate widerspiegelte. Andererseits wurde beschrieben, dass die CSE-Hemmer effektiv in den Zellzyklus eingriffen, indem bestimmte Proteine des Zyklus, wie beispielsweise p27^{kip1} [Laufs, Marra 1999] und p21, nicht herunterreguliert wurden. Indem die DNA-Synthese verhindert wurde, blieb eine Zellteilung aus.

Dieser antiproliferative Effekt konnte in den eigenen Untersuchungen ebenfalls gesehen werden. Auf diese Weise konnte herausgearbeitet werden, dass die Statinbehandlung unter diesen Bedingungen und in diesen Konzentrationen wirksam war. Bereits in den niedrigen Konzentrationen, die für die Versuche verwendet wurden, zeichnete sich eine deutliche Verringerung des Zellwachstums ab. Durch die Statine wurde das Wachstum vollständig gehemmt oder sogar ein Rückgang der Zelldichte erreicht. Die verschiedenen Wirkformen der CSE-Hemmer unterschieden sich in dieser Eigenschaft kaum.

Durch diese Mechanismen könnten die Statine therapeutisch sehr effektiv in der Behandlung proliferativer Prozesse im Rahmen atherosklerotischer Veränderungen eingesetzt werden.

5.3 Die Auswirkungen einer Hemmung des Proteasoms

5.3.1 *Die geringen Atorvastatineffekte sind physiologisch nicht bedeutsam*

Mit Atorvastatin konnte die TL-Aktivität der CPAE-Zellen um 20 % und die ChTL-Aktivität der VSMCs um 15 % gehemmt werden. Diese Hemmung war von der Stärke weit von der entfernt, die durch Lactacystin erzielt wurde. Um physiologisch bedeutsame Effekte der Proteasomhemmung zu erkennen, bedurfte es einer stärkeren Inhibition, als sie durch Atorvastatin erzeugt wurde. Außerdem waren nur einzelne proteolytische Zentren betroffen.

Die ChTL-Aktivität scheint die geschwindigkeitsbestimmende Aktivität für den Abbau der Proteine zu sein [Kisselev 2001]. Somit hätte eine Inhibition dieser Peptidaseaktivität entscheidende Auswirkungen auf zelluläre Vorgänge. In den eigenen Versuchen wurde eine vollständige Hemmung mit Atorvastatin nicht erreicht. Somit spielte die 15 %ige Hemmung der ChTL keine physiologische Rolle. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Intensivierung der ChTL-Hemmung nicht direkt in Beziehung mit der Reduktion des Proteinabbaus stand. Eine stärkere Hemmung der ChTL regulierte entsprechend die Umsatzrate der beiden anderen Aktivitäten hoch [Kisselev 2001].

Anhand vorheriger Ergebnisse zeigte sich, dass eine selektive Hemmung der TL-Aktivität praktisch keine Veränderung der Abbaurate zur Folge hatte. Die Größe der Peptidfragmente blieb erhalten. Es änderte sich lediglich das Peptidprodukt [Kisselev 1999].

Hauptsächlich die Hemmung der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität führte zu einer starken Veränderung des Proteinabbaus [Rock 1994, Heinemeyer 1997]. Um die therapeutisch günstigen Effekte der Proteasominhibition zu erreichen, wäre es aus diesem Grund sinnvoll, die ChTL-Aktivität effektiv zu hemmen. Somit könnte ein günstiges Profil der Regulation geschaffen werden, um die positiven Einflüsse der Proteasomhemmung auf das kardiovaskuläre System zu nutzen. Zu diesem Zweck der Atheroskleroseregulation können die Statine nicht verwendet werden, da sie kein proteasominhibitorisches Potential besitzen.

6 Zusammenfassung

Statine werden in der Therapie von Hypercholesterolämie sehr effektiv eingesetzt. Durch ihren Eingriff in den Cholesterolfstoffwechsel über eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase wird die Bildung des Cholesterols verhindert. Aus therapeutischer Sicht wirken sie sich auf diese Weise sehr günstig auf atherosklerotische Veränderungen aus.

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass β -clasto Lactacystin, ein bekannter Proteasominhibitor, und die CSE-Hemmer gemeinsame biologische Wirkungen aufweisen. Weiterhin ließ sich eine strukturelle Ähnlichkeit, in Form des β -Laktonrings, zwischen den Statinen und β -clasto Lactacystin erkennen [Rao 1999]. Aufgrund dieser Parallelitäten wurde vermutet, dass die Statine ihre Wirkung zum Teil über eine Hemmung des Proteasoms entfalten.

In Zellkulturexperimenten wurden die Effekte von Simvastatin (Prodrug), Atorvastatin, Pravastatin und dem Proteasomhemmer Lactacystin auf zwei Endothelzelllinien (CPAE und Ea.hy926) und primäre vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) bezüglich ihres Verhaltens auf die Morphologie, die Proliferation, die Viabilität und die Proteasomaktivität untersucht. Sowohl die Statine als auch Lactacystin induzierten vergleichbare morphologische Veränderungen und beeinflussten die Proliferation von CPAE-Zellen. In den eigenen Versuchen konnten die durch Statine induzierten Effekte durch Mevalonat revertiert werden. Die durch Lactacystin verursachten Veränderungen wurden durch Mevalonsäure nicht beeinflusst. Wie erwartet hemmte Lactacystin in den untersuchten CPAE-Zellen signifikant die proteasomale Aktivität. Im Gegensatz dazu blieb die Proteasomaktivität nach einer Statinbehandlung unbeeinflusst. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in den Ea.hy926 und den VSMCs deutlich. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sogar hohe Dosen der Statine die Aktivität der gereinigten 20S Proteasomen nicht modulieren.

Anhand der Ergebnisse zeigt sich, dass die ähnlichen biologischen Effekte der Statine und des Lactacystins nicht über den gemeinsamen Mechanismus der Proteasominhibition funktionieren.

Die Statine spielen bei der Regulation des Cholesterolfstoffwechsels eine entscheidende Rolle. Sie werden sehr erfolgreich in der Therapie atherosklerotischer Erkrankungen eingesetzt. Ihre positiven Eigenschaften lassen sich nicht durch eine Modulation der Proteasomaktivität erklären.

Literaturverzeichnis

- 4S 1994:** Scandinavian Simvastatin Survival Group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Lancet*. 1994, *344*, S. 1383-1398.
- Bellosta 1998:** S. Bellosta, F. Bernini, N. Ferri *et al.*: Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*. 1998, *137*, S. 101-109.
- Blanco-Colio 2002:** L. M. Blanco-Colio, A. Villa, M. Ortega *et al.*: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis*. 2002, *161*, S. 17-26.
- Chamley-Campbell 1979:** J. Chamley-Campbell, G. R. Campbell, R. Ross: The Smooth Muscle Cell in Culture. The American Physiological Society. 1979, *59 (1)*, S. 1-61.
- Corti 2002:** R. Corti, V. Fuster, Z. A. Fayad *et al.*: Lipid Lowering by Simvastatin Induces Regression of Human Atherosclerotic Lesions. *Circulation*. 2002, *106*, S. 2884-2887.
- Coux 1996:** O. Coux, K. Tanaka, A. L. Goldberg: Structure and Function of the 20S and 26S Proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 1996, *65*, S. 801-849.
- Craiu 1997:** A. Craiu, M. Gaczynska, T. Akopian *et al.*: Lactacystin and clasto-Lactacystin β -Lactone Modify Multiple Proteasome β -Subunits and Inhibit Intracellular Protein Degradation and Major Histocompatibility Complex Class I Antigen Presentation. *J. Biol. Chem.* 1997, *272*, S. 13437-13445.
- DeMartino 1999:** G. N. DeMartino, C. A. Slaughter: The Proteasome, a Novel Protease Regulated by Multiple Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, S. 22123-22126.
- Desterro 2000:** J. M. P. Desterro, M. S. Rodriguez, R. T. Hay: Regulation of transcription factors by protein degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000, *57*, S. 1207-1219.

- Dichtl 2003:** W. Dichtl, M. J. Frick, H. F. Alber *et al.*: HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thrombi. Vasc. Biol.* 2003, 23, S. 58-63.
- Dick 1996:** L. R. Dick, A. A. Cruickshank, L. Grenier *et al.*: Mechanistic Studies on the Inactivation of the Proteasome by Lactacystin. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, S. 7273-7276.
- Drexler 2000:** H. C. Drexler, W. Risau, M. A. Konerding: Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J.* 2000, 14, S. 65-77.
- Endres 1998:** M. Endres, U. Laufs, Z. Huang *et al.*: Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95, S. 8880-8885.
- Fenteany 1995:** G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane *et al.*: Inhibition of Proteasome Activities and Subunit-Specific Amino-Terminal Threonin Modification by Lactacystin. *Science.* 1995, 268, S. 726-730.
- Fenton II 2002:** J.W. Fenton, II, W. P. Jeske, J. L. Catalfamo *et al.*: Statin Drugs and Dietary Isoprenoids Downregulate Protein Prenylation in Signal Transduction and Are Antithrombotic and Prothrombolytic Agents. *Biochemistry (Moscow).* 2002, 67, S. 85-91.
- Ferrell 2000:** K. Ferrell, C. R. M. Wilkinson, W. Dubiel, C. Gordon: Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *TIBS.* 2000, 25, S. 83-88.
- Forth 1996:** C. Keller, G. Wolfram, N. Zöllner: Fettstoffwechsel; Lipidsenker: Pharmakotherapie bei Fettstoffwechselstörungen. Hrsg.: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 1997, S. 553-561.
- Gao 2000:** Y. Gao, S. Lecker, M. J. Post *et al.*: Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I κ B α degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J. Clin. Invest.* 2000, 106, S. 439-448.
- Goldstein 1990:** J. L. Goldstein, M. S. Brown: Regulation of the mevalonat pathway. *Nature.* 1990, 343, S. 425-430.
-

- Groll 1997:** M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe *et al.*: Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1997, 386, S. 463-471.
- Groll 2000:** M. Groll, M. Bajorek, A. Köhler *et al.*: A gated channel into the proteasome core particle. *Nature structural biology*. 2000, 7 (11), S. 1062-1067.
- Guijarro 1998:** C. Guijarro, L. M. Blanco-Colio *et al.*: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Isoprenylation Inhibitors Induce Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells in Culture. *Circulation Research*. 1998, 83, S. 490-500.
- Hall 1998:** A. Hall: Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*. 1998, 279, S. 509-514.
- Harrison 1997:** D. G. Harrison: Cellular and Molecular Mechanism of Endothelial Cell Dysfunction. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, S. 2153-2157.
- Heinemeyer 1997:** W. Heinemeyer, M. Fischer *et al.*: The Active Site of the Eukaryotic 20 S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing. *J. Biol. Chem.* 1997, 272 (40), S. 25200-25209.
- Hernandez-Perera 2000:** O. Hernandez-Perera, D. Perez-Sala, E. Soria, S. Lamas: Involvement of Rho GTPases in the Transcriptional Inhibition of Preproendothelin-1 Gene Expression by Simvastatin in Vascular Endothelial Cells. *Circulation Research*. 2000, 87, S. 616-622.
- Hernandez-Presa 2002:** M. A. Hernandez-Presa, J. L. Martin-Ventura, M. Ortego *et al.*: Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2002, 160, S. 49-58.
- Istvan 2001:** E. S. Istvan, J. Deisenhöfer: Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science*. 2001, 292, S. 1160-1164.
- Istvan 2003:** E. Istvan: Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements*. 2003, 4, S. 3-8.
- Kisselev 1999:** A. F. Kisselev, T. N. Akopian *et al.*: The Size of Peptide Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes. *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (6), S. 3363-3371.

- Kisselev 2000:** A. F. Kisselev, Z. Songyang, A. L. Goldberg: Why does Threonin, and Not Serin, Function as the Active Site Nucleophile in Proteasomes?. J. Biol. Chem. 2000, 275 (20), S. 14831-14837.
- Kisselev 2001:** A. F. Kisselev, A. L. Goldberg: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. Chemistry & Biology. 2001, 8, S. 739-758.
- Koh 2000:** K. K. Koh: Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. Cardiovascular Research. 2000, 47, S. 648-657.
- Kumar 2002:** B. Kumar, C. Andreatta *et al.*: Mevastatin Induces Degeneration and Decreases Viability of cAMP-Induced Differentiated Neuroblastoma Cells in Culture by Inhibiting Proteasome Activity, and Mevalonic Acid Lactone Prevents These Effects. Journal of Neuroscience Research. 2002, 68, S. 627-635.
- Laufs 2000:** U. Laufs, J. K. Liao: Direct Vascular Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors. Trends of Cardiovascular Medicine. 2000, 10, S. 143-148.
- Laufs und Liao 2000:** U. Laufs, J. K. Liao: Targeting Rho in Cardiovascular Diseases. Circulation Research. 2000, 87, S. 526-528.
- Laufs, Endres 2000:** U. Laufs, M. Endres, N. Stagliano *et al.*: Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. J. Clin. Invest. 2000, 106, S. 15-24.
- Laufs, Liao 1998:** U. Laufs, J. K. Liao: Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA Stability by Rho GTPase. J. Biol. Chem. 1998, 273 (37), S. 24266-24271.
- Laufs, Marra 1999:** U. Laufs, D. Marra *et al.*: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Inhibitors Attenuate Vascular Smooth Muscle Proliferation by Preventing Rho GTPase-induced Down-regulation of p27^{Kip1}. J. Biol. Chem. 1999, 274 (31), S. 21926-21931.
- Lee 1998:** D. H. Lee, A. L. Goldberg: Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. Cell Biology. 1998, 8, S. 397-403.
- Lottspeich 1998:** F. Lottspeich, H. Zorbas: Bioanalytik. 1., Heidelberg - Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998, S. 40-41.

- Löwe 1995:** J. Löwe, D. Stock *et al.*: Crystal Structure of the 20S Proteasome from Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å Resolution. *Science*. 1995, 268, S. 533-539.
- MAAS 1994:** Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study. *Lancet*. 1994, 344, S. 633-638.
- Meiners 2002:** S. Meiners, M. Laule, W. Rother *et al.*: Ubiquitin-Proteasome Pathway as a New Target for the Prevention of Restenosis. *Circulation*. 2002, 105, S. 483-489.
- Meske 2003:** V. Meske, F. Albert, D. Richter, J. Schwarze, T. G. Ohm: Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*. 2003, 17 (1), S. 93-102.
- MIRACLE 2001:** Dr. med. Gregory G. Schwartz *et al.*: Effects of Atorvastatin on Early Recurrent Ischemic Events in Acute Coronary Syndromes. *JAMA*. 2001, 285 (13), S. 1711-1718.
- MRFIT 1982:** Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Multiple Risk Factor Intervention Trial. *JAMA*. 1982, 248 (12), S. 1465-1477.
- Murray 2002:** S. S. Murray, K. N. Tu, K. L. Young, E. J. Bochmann Murray: The Effects of Lovastatin on Proteasome Activities in Highly Purified Rabbit 20 S Proteasome Preparations and Mouse MC3T3-E1 Osteoblastic Cells. *Metabolism*. 2002, 51 (9), S. 1153-1160.
- Negre-Aminou 1997:** P. Negre-Aminou, A. K. van Vliet *et al.*: Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997, 1345 (3), S. 259-268.
- Ortego 1999:** M. Ortego, C. Bustos, M. A. Hernandez-Presa *et al.*: Atorvastatin reduces NF-κB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*. 1999, 147, S. 253-261.
- Pye 2003:** J. Pye, F. Ardeshirpour, A. McCain *et al.*: Proteasome inhibition ablates activation of NF-κB in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003, 284 (3), S. 919-926.

- Rao 1999:** S. Rao, D. C. Porter, X. Chen *et al.*: Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, *96*, S. 7797-7802.
- RECIFE 1999:** J. Dupuis, J.-C. Tardif, P. Cernacek, P. Theroux: Cholesterol Reduction Rapidly Improves Endothelial Function After Acute Coronary Syndromes (The RECIFE Trial). *Circulation.* 1999, *99*, S. 3227-3233.
- Rock 1994:** K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein *et al.*: Inhibitors of the Proteasome Block the Degradation of Most Cell Proteins and the Generation of Peptides Presented on MHC Class I Molecules. *Cell.* 1994, *78*, S. 761-771.
- Serajuddin 1991:** A. T. M. Serajuddin, S. A. Ranadive, E. M. Mahoney: Relative lipophilicities, solubilities, and structure pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J. Pharm. Sci.* 1991, *80*, S. 830-834.
- Stobbe 1996:** Stobbe, Baumann: *Innere Medizin. 7. überarbeitete und erweiterte Auflage*, Berlin / Wiesbaden, Ullstein Mosby GmbH & Co, 1996, S. 321.
- Takemoto 2001:** M. Takemoto, J. K. Liao: Pleiotropic Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, *21(11)*, S. 1712-1719.
- van Vliet 1995:** A. K. van Vliet, C. F. van Thiel *et al.*: Different effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors on sterol synthesis in various human cell types. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1995, *1245*, S. 105-111.
- Werner 2002:** N. Werner, G. Nickenig, U. Laufs: Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol.* 2002, *97*, S. 105-116.
- Wojcik 2000:** C. Wojcik, M. Bury, T. Stoklosa *et al.*: Lovastatin and simvastatin are modulators of the proteasome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2000, *32*, S. 957-965.
- WOSCOPS 1998:** West of Scotland Coronary Prevention Study Group: Influence of Pravastatin and Plasma Lipids on Clinical Events in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation.* 1998, *97*, S. 1440-1445.

- Yeh 2002:** E. T. H. Yeh: Ubiquitin, Proteasome, and Restenosis A Brave New World for cardiovascular Research. *Circulation*. 2002, *105*, S. 408-410.
- Zelvyte 2002:** I. Zelvyte, R. Domainatiene, M. Crisby, S. Janciauskiene: Modulation of inflammatory mediators and PPAR γ and NF κ B expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes in vitro. *Pharmacological Research*. 2002, *45* (2), S. 147-154.

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Karl Stangl für die Bereitstellung dieses interessanten wissenschaftlichen Themas zur Erstellung einer Doktorarbeit. Ich danke für die Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie. Durch ihre Unterstützung, ihren Beistand und vor allem ihre Geduld war es mir möglich, mich intensiv auf die Arbeit an diesem wissenschaftlichen Thema zu konzentrieren.

Weiterhin danke ich meiner persönlichen Betreuerin Frau Dr. Antje Ludwig für die intensive Betreuung, die gewinnbringenden Diskussionen und die zahlreichen Denkanstöße. Weiterhin gilt mein besonderer Dank den beiden MTA Frau Susanne Metzkow und Frau Andrea Weller für die gute und herzliche Zusammenarbeit im Labor. Durch sie habe ich eine Menge gelernt. Außerdem bedanke ich mich bei den anderen MitarbeiterInnen für die herzliche Aufnahme und die sehr hilfreichen Ratschläge. Für die fruchtbaren Diskussionen, vielzähligen Hinweise sowie die Unterstützung bin ich sehr dankbar. Die interessante Tätigkeit und das wunderbare Klima haben mir die Zeit sehr angenehm gestaltet. Danke.

Abschließend danke ich der Arbeitsgruppe um Herr Dr. T. Grune für die Bereitstellung der isolierten 20S Proteasomen. Damit war es mir möglich meine Doktorarbeit weiter zu detaillieren.

Erklärung an Eides Statt

Mit dieser Schrift erkläre ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe dritter Personen verfasst wurde.

Weiterhin erkläre ich, dass keine Auszüge anderer Arbeiten in dieser Promotionsarbeit verwendet wurden.

Ich bestätige, dass alle benutzten Hilfsmittel angegeben wurden und dass alle verwendeten literarischen Quellen im Literaturverzeichnis vollständig sind.

Mit meiner Unterschrift bestätige ich die Angaben.

Berlin im Januar 2005